C.S.A. 121

REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, vol. 3, n.° 1, p. 1-50 ★ Janeiro / Fevereiro, 1961

O caminho certo na terapia da amebíase...

DIANTIL

(Clorbetamida)

Amebicida não-metálico...

de ação intensa...

com doses reduzidas

"Diantil é um amebicida sintético não-metálico que se caracteriza por grande atividade e baixa toxicidade". *E. W. Dennis e D. A. Berberian, Antibiotics & Chemotherapy, 6:554, maio, 1954.*

"O que mais sobreleva notar, no tratamento com Diantil, é sua perfeita tolerância." *D. T. Lucena e R. J. Marques, Revista Brasileira de Medicina, vol. XIII, n.º 11, nov. 1955.*

D 11 - 60

Comprimidos contendo 0,5 g de N-(2,4-diclorobenzil)-N-(2-hidroxietil) dicloroacetamida. Caixas de 24

DIANTIL Marca registrada é um produto **WINTHROP**

WINTHROP

Distribuidores: The Sydney Ross Co., Av. Rio Branco, 251, 11.º and., Rio de Janeiro

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
3(1):1-8, janeiro-fevereiro 1961

CDU 576.8.093.1
:576.851.214

PRESERVAÇÃO DE CULTURAS MICROBIANAS POR PROCESSOS SIMPLES, COM ESPECIAL REFERÊNCIA AOS ESTREPTOCOCOS

Carlos SOLÉ-VERNIN [1]

RESUMO

A manutenção das culturas microbianas requer que haja a preservação de características originais das amostras e não apenas de sua viabilidade. Em microbiologia médica são sobretudo importantes aquelas características que dizem respeito à identificação da amostra e as que estão ligadas aos fatôres de patogenicidade. Para muitas espécies microbianas, a liofilização é o melhor processo de preservação, entretanto não é acessível a todos os técnicos que dela poderiam necessitar.

Nesta investigação foram observados três processos de conservação cuja característica básica é a sua acessibilidade técnica: Culturas ou suspensões microbianas — 1) em sangue fluido desfibrinado estéril de coelho normal; 2) em sôro inativado de coelho normal, acrescido, ou não, de carvão (sobretudo para os vírus); 3) em sôro inativado de coelho normal, acrescido, em partes iguais, de gema de ôvo diluída em salina, também em partes iguais (principalmente para o gênero *Mycobacterium*.

As culturas foram conservadas em ampolas de 1 ml fechadas à chama, guardadas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

Foram observadas 423 amostras de micróbios pertencentes a muitas famílias, gêneros e espécies. Nesse total contam-se 367 bactérias (das quais 222 são estreptococos), 6 vírus, 48 cogumelos, 1 alga verde e 1 protozoário.

O maior prazo contínuo de observação foi de 29 meses (para o estreptococo). As características microbianas de importância taxonômica e as que se referem aos fatôres de patogenicidade foram tôdas mantidas durante o prazo em que se manteve a viabilidade; além disso, em alguns casos observou-se reaquisição de características como costuma acontecer por meio de inoculações *in vivo*.

INTRODUÇÃO

Nos processos de manutenção de culturas, a conservação da viabilidade ainda que òbviamente essencial, não constitui todo o problema; ligada a ela de modo inseparável está a questão da preservação das propriedades culturais que o microbiologista considera importantes (WEISS [7]). Em microbiologia médica há interêsse em preservar, além das características de significação taxonômica, aquêles fatôres de algum modo ligados à patogenicidade da espécie e que condicionam o grau de virulência da amostra.

Entre os numerosos processos propostos para a conservação de culturas microbianas aquêles que mais garantida e prolongadamente preservam intactas as características originais são os de dessecação (ENGLEY Jr.[1]). No entretanto, êstes processos estão na dependência de aparelhagem custosa e de rea-

Inst. Med. Tropical de São Paulo — Depart. de Microbiologia e Imunologia da F.M.U.S.P. (Prof. C. S. Lacaz) e Instituto de Microbiologia da Universidade do Brasil (Prof. P. de Góes).

(1) Assistente de Microbiol. e Imunol.

lização técnica relativamente complicada, tornando-os inacessíveis aos laboratórios interessados quando se localizam nas amplas áreas geográficas em que o progresso técnico não atingiu certo nível.

Para a maioria dos laboratórios de microbiologia de nosso país, o seu valioso trabalho consiste no isolamento dos agentes etiológicos, e identificação mais ou menos sumária, seguida da perda das amostras. Esta perda de amostras limita a sua capacidade de realização científica, quer sob o ponto de vista clínico, quer microbiológico, epidemiológico ou mesmo de pura investigação. Os próprios centros de ensino, na ocasião das aulas de demonstração sôbre determinados micróbios, muitas vêzes se limitam a projetar diapositivos de questões essencialmente técnicas, por falta dos micróbios adequados, no tempo oportuno.

O objetivo imediato das presentes investigações consistiu em verificar se certos processos de conservação de culturas, que fôssem rigorosamente acessíveis ao mais modesto laboratório de microbiologia, não seriam capazes de preservar algumas características consideradas importantes durante lapso de tempo suficientemente longo.

AMOSTRAS MICROBIANAS OBSERVADAS

Foram observadas 423 amostras de micróbios pertencentes a muitas Famílias, Gêneros e Espécies. Nesse total contam-se 367 bactérias (das quais 222 são estreptococos), 6 vírus, 48 cogumelos, 1 alga verde e 1 protozoário. Na relação que se segue, depois da denominação de cada micróbio, consta, entre parênteses, o número de amostras que dêle foram observadas.

Bactérias: *Pseudomonas aeruginosa* (1); *Flavobacterium meningosepticum* (2); *Escherichia coli*, dos sorotipos patogênicos: 025:11 L (1), 026:B6 (1), 055:B5 (1), 086:B7 (1), 0111:B4 (1), 0127:B8 (1), 0128:B12 (1); *Klebsiella* sp. (1); *Serratia marcescens* (1); *Salmonella typhi* (com "Vi") (1); *Shigella dysenteriae*, A2 (1), A3 (1), A4 (1), A5 (1), A6 (1), A8 (1); *Shigella flexneri*, B 1b (1), B 2a (1), B 2b (1), B 3 (1), B 4a (1), B 4b (1), B 5 (1), B 6 (1); *Shigella boydii*, C 1 (1), C 2 (1), C 4 (1), C 5 (1), C 6 (1), C 7 (1), C 8 (1), C 9 (1), C 10 (1); *Shigella sonnei* (1); *Bordetella pertussis* (1); *Brucella abortus* (1); *Brucella suis* (1); *Brucella melitensis* (2); *Haemophilus* sp. (2); *Staphylococcus aureus* (45); outros cocos Gram positivos em cachos, coagulase negativos (14); *Neisseria gonorrhoeae* (6); *Diplococcus pneumoniae* (5); *Streptococcus*, beta-hemolíticos, dos grupos: não determinado (26); Grupo A (*Streptococcus pyogenes*) dos tipos: não determinado ou não tipável (14), tipo 11 (1), tipo 12 (1), tipo 14 (1), tipo 47 (1); grupo B (*Streptococcus agalactiae*) (4); grupo C, dos tipos, humano (11), *Streptococcus equisimilis* (1), *Str. equi* (1); grupo D, espécie não determinada (2); grupo E (1); grupo F (1); grupo G (12); grupo K (1); grupo L (1); grupo O (4); *Streptococcus* viridescentes, espécies não determinadas (56); *Streptococcus salivarius* (7); *Streptococcus sanguis*, tipos não determinados (22), tipo I-II (1); *Str.* sp. dextran-positivo (1); *Str. acidominimus* (14); *Str. mitis* (22); *Str. equinus* (2); *Str. uberis* (1); *Str. bovis* (1); *Str. dysgalactiae* (grupo C) (1); Enterococos, espécies não determinadas (5); *Str. faecalis* (3); *Str. liquefaciens* (2); Grupo láctico, *Str. lactis* (1). *Corynebacterium* sp., saprófitas (2); *C. diphteriae*, virulentas (inclusive amostra Park-8) (9); *Listeria monocytogenes*, dos tipos sorológicos, 1 (1), 2 (1), 3 (1), 4 A (1), 4 B (1); *Bacillus subtilis*, var. *niger* (1); *Clostridium perfringens* (2), *Cl. tetani* (1); *Mycobacterium tuberculosis* (1), *Myc. bovis* (amostra BCG) (1); *Actinomyces brasiliensis* (8); *Leptospira icterohaemorrhagiae* (1).

Vírus: Vírus da poliomielite, dos tipos sorológicos 1 (1), 2 (1), 3 (1). Adenovírus, dos tipos sorológicos 3 (1), 4 (1), 7 (1).

Cogumelos: *Candida* sp. (1); *C. albicans* (1); *C. brumpti* (1); *C. parapsilosis* (1); *Torulopsis utilis*, var. *thermogensis* (1); *Geotrichum asteroides* (1); *Rhodotorula* sp. (2); *Sporotrichum schenckii* (10); *Trichophyton rubrum* (2); *T. schoenleini* (2); *T. violaceum* (2); *Microsporum canis* (2); *Pullularia pullulans* (10); *P. schawi* (1); *P. bergeri* (1); *Hormodendrum* sp. (1); *H. fontoynonti* (1); *Madurella grisea* (1); *M. mycetomi* (1); *Piedraia hortai* (1); *Paracoccidioides brasiliensis* (5).

Algas: *Chlorella vulgaris* (1).

Protozoários: *Trypanosoma cruzi* (1).

As observações neste trabalho registradas se estenderam por 33 meses, sendo que o maior prazo contínuo de observação foi de 29 meses (para estreptococos).

PROCESSOS DE CONSERVAÇÃO

Numa publicação anterior (SOLÉ-VERNIN [5]) foram discutidos detalhadamente os fundamentos técnicos dos processos de conservação adotados neste estudo.

Dos três processos simples investigados, o mais extensamente foi aquêle que adota como preservador o sangue fluido desfibrinado estéril de coelho normal; a cultura, ou a suspensão do germe em sangue é guardada à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, em ampolas de 1 ml fechadas à chama; a sua transferência se faz por meio de pipetas Pasteur.

Foram também investigadas as possibilidades preservadoras do sôro inativado de coelho normal, acrescido de carvão * na proporção aproximada de 0,03 g/ml (principalmente para os vírus), ou acrescido, em partes iguais, de gema de ôvo diluída em salina, também em partes iguais (principalmente para o gênero *Mycobacterium*).

Nestas investigações o poder microbicida do sangue e do sôro, cuja capacidade é òbviamente limitada, foi controlado de diversas maneiras: pela inativação do complemento durante a prova de esterilidade do sangue ou do sôro (permanência na estufa a 37°C durante 24 horas), pelo afastamento da hemoglobina (uso do sôro) quando houver provas de sensibilidade do germe em questão ao seu poder antimicrobiano, pela pasteurização do sôro (60°C, 10 horas), pela inativação do sôro (75°C, 30 minutos), pela inativação de fatôres tóxicos do sôro por meio de carvão e pelo plantio, quer no sangue, quer no sôro, de grandes inóculos.

* "Carbon, Decolorizing (Norit F.Q.P.), Practical for chemical purposes, not for drug use, Eastman Kodack Co., Rochester 3, N.Y., U.S.A.".

RESULTADOS

Referências minuciosas aos resultados foram feitas numa publicação anterior (SOLÉ-VERNIN [5]); aqui faremos uma apreciação sumária.

As enterobactérias (*Escherichia, Klebsiella, Serratia, Salmonella* e *Shigella*) e outros bastonetes Gram negativos (*Pseudomonas, Flavobacterium, Brucella*) preservaram-se muito bem em sangue durante todo o período de observação (88 a 236 dias, pelo menos), mantendo as suas características originais de identificação.

Entre as enterobactérias, que sempre mantiveram a sua capacidade de serem aglutinadas pelos soros específicos, observaram-se adicionalmente, dois fatos interessantes. Em primeiro lugar, a amostra de *E. coli* do sorotipo patogênico 055, que se tinha mostrado, antes do período de conservação, repetidamente termo-instável a ponto de a abandonarmos como antígeno para produção de anti-sôro aglutinante, após 176 dias de conservação em sangue, passou a termo-estável.

O segundo fato se refere à aquisição ou desenvolvimento de antígeno K, do tipo B (termolábil) em amostras de *Shigella dysenteriae* A2 e A3 (mas não houve em A4, A5 e A6). Aquelas amostras, antes da conservação em sangue, vinham sendo conservadas em ágar-simples e não necessitavam ser fervidas para aglutinarem no seu sôro específico O; após 143 dias de conservação em sangue, porém, não aglutinaram no mesmo sôro específico O, a não ser após a fervura.

Bordetella, Haemophilus e *Neisseria* parece preservarem-se bem em sangue até 1 mês. *Bordetella* sobreviveu, numa oportunidade que talvez deva ser considerada ocasional, a 118 dias em sangue; no fim dêsse período mostrou aglutinação específica, morfologia cocóide e o mesmo grau de virulência (dermonecrose em coelhos e morte de camundongos inoculados por via intracerebral) de antes da conservação. Parece que a conservação em gema + sôro pode prolongar a viabilidade de *Bordetella* e *Neisseria* pouco além de 1 mês. Para *Bordetella* a preservação em sangue foi melhor que em sôro + carvão; neste último caso a viabilidade não foi além de poucos dias.

Staphylococcus, e outros cocos Gram-positivos em cachos, coagulase-negativos (a prova da coagulase foi sempre feita em plasma humano). Estas bactérias se conservaram muito bem em sangue durante todo o período de observação (64 a 211 dias, pelo menos). Limitado número de amostras conservadas também em sôro + carvão não demonstrou menor viabilidade nem alterações quanto à positividade da estafilocoagulase. Dentre as 15 amostras inicialmente coagulase-negativas *, 5, inclusive a amostra "Wood", passaram a positivas (33%). Mas não observamos nenhuma (0%) dentre as 44 originàriamente coagulase-positivas, que houvesse passado a coagulase-negativa.

Parece, portanto, que o sangue mantém boa a viabilidade do estafilococo simultâneamente com a sua capacidade de produzir coagulase e, mais ainda, devolve a positividade desta prova às amostras que a hajam perdido.

Os *pneumococos* preservaram-se bem (bile-solubilidade e patogenicidade para o camundongo) até 80-90 dias e para isso a hemoglobina pareceu necessária, uma vez que o sôro apenas não ofereceu a mesma proteção. Até o final daquele período de observação não se notou diferença entre as duas temperaturas de conservação experimentadas: (1) ambiente, inverno e (2) estufa contínua a 32°C.

Uma das amostras de pneumococo, após 8 meses de conservação, mostrou-se uniformemente viável (4 vêzes em 4 experiências) quando conservada em sôro + carvão, em ambas as temperaturas adotadas; quando conservada em sôro apenas, ou em sangue, a viabilidade positiva foi observada em cada caso apenas 1 vez em 4 experiências. Em qualquer circunstância a amostra viável se mostrou sempre bile-solúvel e patogênica para o camundongo.

Streptococcus — Ao fim de 12 meses observou-se perda de mais de 20% das amostras de estreptococos viridescentes conservadas e, dos 12 aos 29 meses de conservação, a viabilidade das amostras decresceu ràpidamente, de modo a observarmos, no fim dêsse período, perda de mais de 80% das amostras conservadas. Entretanto, devemos notar que os enterococos viridescentes, por exceção, conservam-se muito bem durante o mesmo período.

Com relação ao tipo de hemólise viridescente, às provas bioquímicas e à prova de resistência a que êsse grupo de bactérias é submetido para fins de classificação, observamos certa freqüência de variação de comportamento, que, evidentemente, faz supor, certa instabilidade de comportamento do grupo viridescente.

Os estreptococos β-hemolíticos, entretanto, conservaram-se muito bem em sangue até 28 meses pelo menos, com exceção de amostras dos grupos sorológicos A e F que, a partir dos 12 meses, começam a demonstrar menor viabilidade. Em qualquer época em que os β-hemolíticos se mostraram viáveis não perderam nem a capacidade característica β-hemolítica e nem a sua antigenicidade com relação aos antígenos "C" (polissacarídeo) e "M" (proteína) que lhes dão individualização respectivamente de grupo e de tipo dentro do grupo A, sendo os resultados da classificação sorológica, depois do período de conservação, idênticos aos de antes dêsse período (UPDYKE [6]).*

Amostras saprofíticas do gênero *Corynebacterium* conservaram-se muito bem até 203 dias, pelo menos. Quanto ao bacilo diftérico virulento, a capacidade de preservar-se em sangue parece depender muito da amostra, pois, se em alguns casos a sobrevivência atingiu 23 meses pelo menos, amostra houve em que não resistiu a 7 meses; a virulência (inoculações intradérmicas em coelho, subcutânea em cobaio e toxigenicidade *in vitro*) sempre se manteve com a viabilidade.

Listeria monocytogenes preservou-se muito bem até 137 dias, pelo menos. Dos tipos sorológicos observados, 4 mantiveram a prova de ANTON positiva. O 5.° tipo sorológi-

* Entre as quais uma amostra "Wood", conservada ininterruptamente em ágar-sangue em pé, coberta com óleo mineral estéril, por mais de 2 anos e que era coagulase positiva antes dessa conservação.

* Segundo UPDYKE [6], presentemente estão sendo feitas no "C.D.C." observações com elevado número de amostras para mais extensa comprovação da manutenção de "M" pelo processo.

co observado (4A) mostrou virulência aparentemente exaltada após o período de conservação.

O bacilo tetânico mostrou-se mais sensível à hemoglobina do que o *Cl. perfringens* e do que o *Bacillus subtilis*. O simples meio de HITCHENS em ampolas não se mostrou suficiente para preservar a viabilidade de *Cl. perfringens* até 90 dias. A mistura sôro + carvão conservou muito satisfatória a viabilidade do bacilo tetânico durante um período (80 dias) em que o sangue tinha esterilizado a amostra.

O bacilo da tuberculose humana e o BCG conservaram-se muito bem até 101 dias, pelo menos, na mistura gema + sôro; o bacilo da tuberculose humana não demonstrou perda de virulência, sendo capaz de produzir tuberculose generalizada em cobaias, depois do período de conservação, tal como produzia antes. A mistura sôro + carvão, porém, foi incapaz de manter a viabilidade pouco além de uns dias.

Actinomyces brasiliensis não se conservou de modo satisfatório, já que das 8 amostras submetidas à conservação em sangue, apenas 2 sobreviveram ao período verificado (67 a 139 dias).

Leptospira icterohaemorrhagiae não sobreviveu ao período verificado (123 dias).

Vírus — Parece: a) que o aquecimento a 60°C durante 10 horas (pasteurização) torna as qualidades preservadoras do sôro, frente ao vírus observado, inferiores às do aquecimento a 75°C durante 30 minutos; b) que a adição de carvão ao sôro contribui para aumentar as suas propriedades preservadoras; c) que a mistura sôro + carvão tem capacidade preservadora comparável à do líquido de Hanks, nas condições da experiência. Confirmou-se, mais uma vez, que as temperaturas elevadas (32°C contínuos) são mais eficientes na inativação dos vírus que as menos elevadas (temperatura ambiente de inverno em São Paulo, dentro do laboratório sem aquecimento especial) e que os adenovírus são mais resistentes que os vírus da poliomielite às condições a que foram submetidos.

Na experiência em que se empregou sôro (não hemolisado, aquecido a 75°C, 30 minutos) + carvão, verificou-se, ao fim de 96 dias (temperatura ambiente) viabilidade de alto nível para todos os vírus observados, de acôrdo com o efeito citopatogênico, em comparação com os vírus conservados no líquido de Hanks (em "deep-freezer").

Cogumelos — Os resultados pareceram especialmente bons para as leveduras, sobretudo as do gênero *Candida*, que se conservaram muito bem até 160 dias, pelo menos. Talvez possam ser considerados bons para *Paracoccidioides brasiliensis* e *Sporotrichum schencki* até 160 dias; para muitos bolôres, entretanto, o processo não foi satisfatório. Sempre que houve sobrevivência, mantiveram-se inalterados os caracteres morfobiológicos típicos das culturas.

Chlorella vulgaris — As observações feitas parecem suficientes para indicar a ação deletéria que exercem sôbre *Chlorella*: 1) a privação da luz; 2) a privação de contato renovado com o ar; 3) a ação da hemoglobulina. Dentro dos prazos de observação verificados, quando um só dêsses fatôres exerceu sua ação, foi possível a sobrevivência, ainda que com menor número de unidades viáveis, mas quando 2 ou 3 dêsses fatôres agiram simultâneamente, foi impossível recuperar a cultura. Ao contrário, resultados semelhantes aos obtidos em apenas 48 horas de conservação (crescimento profuso) foram verificados após 65 dias de conservação, quando *Chlorella* foi conservada simultâneamente sem contato com hemoglobina (em sôro + carvão), exposta à luz difusa do dia e em contato renovado com o ar, pela abertura periódica da mesma ampola para as sucessivas verificações semanais de viabilidade.

Trypanosoma cruzi — Foi observada sobrevivência de 43 dias para êste protozoário em sangue, mas não em sôro; entretanto, aos 62 dias de conservação, já não foi mais possível obter cultura positiva.

Habitualmente as culturas de tripanosomas, em meio de MUNIZ & FREITAS, perdem a virulência através de repiques sucessivos por vários meses, como foi o caso da cultura

com que trabalhamos, mas, infelizmente, não foi feita prova de virulência antes de submeter a amostra ao processo de conservação. De qualquer modo, pode-se dizer, diante dos altos níveis de parasitemia em camundongos jovens que a amostra causou, depois de conservada em sangue durante 19 dias, pelo menos, que o processo preserva a virulência; determinações mais minuciosas de graus de virulência para tripanosomas, antes e durante o prazo de conservação, parecem oportunas.

COMENTÁRIOS

Numa publicação anterior (SOLÉ-VERNIN [5]) fizemos revisão bibliográfica sôbre o emprêgo do sangue como meio de cultura e conservador de micróbios.

Devemos sobretudo a PERGHER [3] as observações mais sistemáticas de que se dispõe sôbre a conservação de bactérias em geral por êsse processo. Suas observações tiveram o mérito de atingir prazos de 5, 10 e mais anos, mas o número de espécies e de amostras incluído foi muito limitado, quase sempre enterobactérias, e delas não foram fornecidas informações que os novos conhecimentos exigem. Uma reconsideração do processo à luz dos atuais conhecimentos, cobrindo ampla variedade de gêneros e de espécies, pareceu-nos justificável, e mesmo necessária, dada a acessibilidade de técnica.

Ao contrário de certos meios de cultura para os quais algum ingrediente poderia ser de obtenção limitada (peptonas de tipo especial, por exemplo), o sangue de coelho é de fácil obtenção, tem pH "já acertado" em "nível fisiológico" e apresenta acentuada uniformidade de composição. Sob o ponto de vista nutritivo pode ser considerado relativamente completo. Trata-se de tecido líquido cujas vantagens como elemento adicional a meios de cultura são clássicos em bacteriologia, sobretudo para germes patogênicos exigentes, promovendo o desenvolvimento microbiano.

Nas sucessivas provas de viabilidade de determinada cultura realizadas neste trabalho, o restante do conteúdo da ampola foi reaproveitado, transferindo-o para nova ampola. Seria interessante verificar a influência da aeração periódica da cultura em sangue decorrente dêsse reaproveitamento, à semelhança do que foi feito com *Chlorella*.

*
* *

Convém referir à parte um aspecto uniforme dêsses achados experimentais, referente à preservação, e mesmo reaquisição de fatôres de patogenicidade.

Em todos os casos investigados, que incluem a quase totalidade das observações, registrou-se a manutenção, sem falhas, do grau de virulência ou dos fatôres de patogenicidade: proteína "M" dos estreptococos β-hemolíticos do grupo A, prova de ANTON positiva para *Listeria*; prova de WELCH & NUTTAL para *Clostridium perfringens*, cápsula e virulência do pneumococo para o camundongo, estrutura antigênica de fase lisa nas enterobactérias patogênicas, antígeno "Vi" na *Salmonella typhi*, a fase I de LESLIE & GARDNER na *Bordetella pertussis*, a coagulase dos estafilococos, as provas de virulência do bacilo diftérico, a capacidade de produzir tuberculose generalizada em cobaia pelo *Mycobacterium tuberculosis*, a capacidade do *Trypanosoma cruzi* de produzir altos níveis de parasitemia em camundongos. Mais ainda do que essa manutenção, verificamos, também, a reaquisição de antígeno K (do tipo B, termolábil) em amostras de *Shigella dysenteriae* A2 e A3, a devolução à termo-estabilidade de suspensões de *Escherichia coli* 055, a devolução à positividade da prova de coagulase para *Staphylococcus* e provàvelmente, a exaltação de virulência de *Listeria monocytogenes* 4A à prova de ANTON.

Essas observações parecem indicar a possível utilidade do sangue como preservador dos fatôres de patogenicidade, o que seria, sem dúvida, digno de observações mais detalhadas.

Com efeito, em microbiologia médica, a mais recente tendência de investigação preconiza (SMITH [4]) a necessidade de estudar os fatôres de patogenicidade e a medida dos graus de virulência em micróbios "cultivados *in vivo*", estando claras as restrições dos resultados obtidos com populações microbianas desenvolvidas nos meios comuns de cultura.

SOLÉ-VERNIN, C. — Preservação de culturas microbianas por processos simples, com especial referência aos estreptococos. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 3(1):1-8, 1961.

O processo de conservação de micróbios no sangue (que é um tecido líquido animal, sem defesas *in vitro*, ou de defesas ràpidamente em declínio) parece ser o modêlo experimental que mais aproximadamente repeteria as condições do hospedeiro vivo, privado de defesa, na facilidade de uma cultura *in vitro*. Foi dêsse modo que HARRIS-SMITH, SMITH & KEPPIE [2] conseguiram demonstrar a produção de toxina pelo *Bacillus anthracis* que prèviamente só tinha podido ser reconhecido *in vivo*. Os nossos achados experimentais sugerem mais ampla significação dêsse gênero de pesquisa sôbre fatôres de patogenicidade e virulência microbianas.

*
* *

Em síntese, é possível conservar a viabilidade de amostras de diversas espécies microbianas por processos simples, de grande acessibilidade técnica, durante prazos superiores aos que habitualmente se estabeleceram como necessários (WEISS [7]) aos repiques periódicos em meios especiais de cultura. Os processos recomendados demonstraram preservar características microbianas importantes como as que se referem ao diagnóstico microbiológico preciso da espécie e a seus fatôres de patogenicidade. Ainda tomando como têrmo de comparação os repiques periódicos nos meios especiais de cultura, verificamos que os processos estudados estão pouco sujeitos a contaminações (conclusão baseada em perto de 800 verificações de viabilidade), requerem muito pequeno espaço de armazenagem à temperatura ambiente e prestam-se melhor ao transporte de culturas, desde que sejam tomadas as medidas habituais recomendadas ao envio de micróbios pelo correio.

Assim, pode-se concluir pelos bons serviços que os processos estudados neste trabalho prestam em certas circunstâncias tecnológicas:

1) quando o repique muito freqüente não fôr possível, ou quando estiver contra-indicado;

2) quando houver contra-indicações de conservação sob óleo mineral estéril (transporte, etc.);

3) quando não se dispuser de algum processo de dessecação (liofilização, etc.).

SUMMARY

Preservation of microbe cultures by simple techniques, with special regard to streptococci.

Maintainance of microbe cultures demand preservation of the original features of samples and not only their viability. As regards medical microbiology, great importance is attached to those features that make for identification of a given sample and which are related to the pathogenicity factors. For a great many microbial strains lyophilization is the best preservation technique; nevertheless, it is not accessible to all laboratory technicians who might need it.

Our research involves observation of three preservation techniques whose basic feature is their technical accessibility: Microbial cultures or suspensions, 1) in sterile defibrinated fluid blood of normal rabbits; 2) in inactivated serum of normal rabbits, to which coal has or has not been added (especially for viruses); 3) in inactivated serum of normal rabbits, to which an equal amount of a half-and-half solution of egg yolk in saline has been added (especially for the genus *Mycobacterium*).

The cultures were kept in flame-sealed 1 ml ampules, at room temperature and in the dark.

423 samples of microbes pertaining to a number of families, genuses and species have been observed. Among these there were 367 bacteria (streptoccoci numbering 222), 6 viruses, 48 fungi and yeasts, 1 green alga and 1 protozoon.

The most protracted continuous lapse of observation time has been of 29 months (for streptococci). The microbial features of taxonomic importance and those related to the pathogenicity factors have all of them been preserved during the viability period; besides, there were some cases where reacquisition of features was observed, as it usually happens through *in vivo* inoculations.

AGRADECIMENTOS

O Autor deseja expressar os seus agradecimentos ao Dr. Laerte de Andrade (Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Estado da Guanabara), por ter chamado sua atenção para o processo de conservação em sangue; ao Prof. Carlos da Silva Lacaz (Departamento de Microbiologia e Imunologia da F.M.U.S.P.), pela leitura crítica do trabalho e pelo reconhecimento dos caracteres morfobiológicos dos cogumelos; à Dra. Elaine L. Updyke ("Communicable Disease Center", Chamblee, Georgia, USA), pela grupagem e tipagem dos estreptococos; ao Dr. Renato Piza de Souza Carvalho (Departamento de Microbiologia e Imunologia da F. M.U.S.P.), pelas observações do efeito citopatogênico dos vírus; ao Dr. Luiz R. Trabulsi (Departamento de Microbiologia e Imunologia da F.M.U.S.P.), pelo auxílio nas aglutinações das enterobactérias; ao Dr. Rosalvo Guidolin (Instituto Pinheiros, São Paulo), pelas verificações de virulência de *Bordetella pertussis*. E, por fim, aos numerosos colegas que generosamente lhe ofereceram amostras de micróbios para observações.

REFERÊNCIAS

1. ENGLEY *Jr.*, F. B. — The persistence (survival) of microorganisms. III. In culture media. Texas Rep. Biol. & Med. **14**:114-203, 1956.

2. HARRIS-SMITH, P. W.; SMITH, H. & KEPPIE, J. — Production *in vitro* of the anthrax toxin previously recognized *in vivo*. J. gen. Microbiol. **16**:viii, 1957.

3. PERGHER, G. — La conservazione dei microbi asporigeni in sangue. Ann. Igiene **37**: 438-445, 1927.

4. SMITH, H. — The use of bacteria grown *in vivo* for studies on the basis of their pathogenicity. Ann. Rev. Microbiol. **12**:77-102, 1958.

5. SOLÉ-VERNIN, C. — Contribuição para o estudo da conservação de culturas microbianas, com especial referência aos estreptococos. São Paulo, 1960. Tese Fac. Med. Univ. São Paulo.

6. UPDYKE, E. L. — Comunicação pessoal, 1959.

7. WEISS, F. A. — Maintenance and preservation of cultures. (*In* Society of American Bacteriologists — Manual of microbiological methods. New York, McGraw-Hill, 1957. p. 99-119; 106-107).

Recebido para publicação em 20 novembro 1960.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
3(1):9-14, janeiro-fevereiro 1961

CDU 576.8.093
:616.995.132.2-078

NOVA MODIFICAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE LOOSS-BAERMANN PARA PESQUISA DE LARVAS DO *STRONGYLOIDES STERCORALIS* NAS FEZES: TÉCNICA DO PIRES

Francisco Ferriolli Filho (1)

RESUMO

O autor descreve uma nova técnica de extração de larvas de *S. stercoralis*, na qual as fezes, dispostas sôbre uma peneira de tela de cobre com 7 cm de diâmetro e com 1.225 malhas por cm^2, são postas em contato com a água contida em um pires de vidro Pyrex de 9 cm de diâmetro. Para evitar a exposição ao ar, as fezes são recobertas com uma latinha munida de pequenos orifícios. As larvas que migram para o pires são pesquisadas ao microscópio entomológico com objetiva 4x e ocular 5x. Quando partículas fecais minúsculas ou substâncias solúveis passam para a água do pires, o que acontece em casos raros, produzindo uma turvação que impede a visualização das larvas, a água é transferida para um tubo de centrífuga, centrifugada a 1.500 r.p.m. durante 2 minutos e o sedimento examinado entre lâmina e lamínula.

Esta técnica, além de simples, fácil de executar, higiênica e econômica, dá resultados idênticos a outras. Em 53 amostras de fezes positivas, submetidas à extração simultâneamente pela técnica de Looss-Baermann modificada e pela técnica do pires, o autor obteve respectivamente 92,45% e 94,34% de positividade, não havendo diferenças significativas entre êstes resultados.

INTRODUÇÃO

Looss [14] apresentou um método para isolamento de larvas de ancilostomídeos que tinha por base o hidrotropismo positivo das mesmas e que vinha complementar o método de cultura de fezes proposto por Leichtenstern [12]. Aquêle autor fazia coprocultura com carvão animal em placa de Petri e depois procedia a extração das larvas do seguinte modo: retirando da estufa a mistura fezes-carvão, expunha-a ao ar para dessecar as camadas superficiais e, depois, colocava água até cobrir todo o material. Sendo dotadas de hidrotropismo positivo, em pouco tempo as larvas abandonavam o meio de cultura e passavam para a água; esta era, então, decantada e examinada.

O método de Looss deu origem a inúmeras variantes que podemos classificar em três grupos: as técnicas em que as fezes são colocadas em contato direto com a água e as que as fezes são dispostas sôbre um pedaço de tecido ou de tela metálica e postas em contato com a água respectivamente em um funil ou em um cálice de sedimentação.

A. *Técnicas que utilizam o contato direto das fezes com a água* — Consistem fundamentalmente em colocar fezes (ou culturas) em contato direto com a água e pesquisar nesta as larvas que migraram.

Rousseau (*in* Levin [13]) recomenda comprimir a amostra de fezes entre duas lâminas, dando-lhe um formato circular, e em seguida colocar água em tôrno das fezes. Em pouco tempo as larvas passam das fezes

Fac. Med. Ribeirão Prêto — Dep. Parasitologia (Diretor: Prof. M. P. Barretto).
(1) Assistente.

para o líquido onde podem ser fàcilmente observadas.

KOLMER & BOERNER [9] aconselham tomar uma porção de fezes formadas, nelas fazer uma escavação e aí colocar água. As larvas migram das fezes para a água onde são colhidas após 24 horas de incubação a 37°C. Êste método foi recomendado por SIMPSON [18] e por KYLE, MCCAY & SPARLING [15].

COUTINHO, CAMPOS & AMATO [6] propõem uma técnica baseada nesse princípio: colocam 2 a 3 g de fezes numa placa de Petri e circundam-na com água a 40-42°C. Após 60 minutos as larvas são encontradas na água, com auxílio de um microscópio entomológico, recolhidas e identificadas, depois de coradas pelo lugol.

B. *Técnicas que empregam um funil* — Nas variantes dêste tipo as fezes são colocadas sôbre um retalho de tela metálica ou de tecido. Êste é adaptado a um funil tendo na haste um tubo de borracha pinçado com pinça de Mohr, funil êste que é prèviamente cheio com água até uma altura tal que as fezes fiquem parcialmente imersas. É fundamentalmente o método de BAERMANN [1] usado para a extração de larvas de nematóides do solo, método êste que foi muito bem padronizado para pesquisa de larvas de ancilostomídeos por CORT *et al.*[5].

Êste método foi, ao que parece, utilizado pela primeira vez para a extração de larvas de *S. stercoralis* das fezes por SANDGROUND [17]. Êste autor aconselhava misturar fezes com carvão e deixar durante 27 a 30 horas à temperatura ambiente. Em seguida fazia a extração das larvas colocando a cultura sôbre um pedaço de tecido de algodão grosseiro prêso às bordas de um funil de Baermann cheio de água a 40-42°C.

LEE [11] valia-se de um funil forrado com tela metálica sôbre a qual espalhava areia esterilizada. A haste do funil era ligada a uma ponta de pipeta por um tubo de borracha pinçada com uma pinça de Mohr. As fezes eram misturadas com areia e colocadas sôbre a camada de areia que forrava a tela do aparelho. Dêste modo não havia o contato direto entre as fezes e a tela, evitando-se, assim, o acúmulo de detritos no tubo coletor. Enchia o aparelho cuidadosamente com água, até cobrir o material em exame, e deixava em estufa a 37°C durante 90 minutos. Findo êste prazo, colhia a água do funil e nela procurava as larvas.

MORAES [15] introduziu no Brasil a técnica de Baermann-Lee com algumas modificações: as fezes são colocadas sôbre uma tela metálica recoberta por gaze e adaptada ao funil. O tubo de borracha prêso à haste do funil terminava em um tubo de hemólise. Após 60 a 90 minutos de extração as larvas estavam coletadas no tubo de hemólise; êste era removido e o seu conteúdo vertido em vidro de relógio para exame.

COUTINHO, CAMPOS & AMATO [6], tendo em vista que o ato de retirada do tubo de hemólise dava margem à contaminação do operador, substituíram-no por uma ponta de pipeta e fechamento do tubo de borracha por uma pinça de Mohr, como na técnica de LEE [11].

Em trabalho anterior (FERRIOLLI Filho [8]) apresentamos algumas modificações da técnica acima, modificações estas que consistem na substituição da tela metálica de malhas largas e recoberta por gaze, por uma tela metálica de 1.225 malhas por cm^2. Além disso procuramos eliminar a exposição das fezes ao ar cobrindo-as com uma latinha perfurada. Os orifícios da latinha impedem que se forme uma câmara de ar que, fazendo pressão sôbre a superfície da água, dificulta um amplo contato da mesma com as fezes. Neste mesmo trabalho evidenciamos a utilidade do lenço-papel "Yes" (Johnson & Johnson), forrando a tela para os casos em que as fezes se apresentem liquefeitas. Deve-se ressaltar que LOOSS [14] já fazia o uso do papel-filtro para isolar larvas de culturas de fezes.

C. *Técnicas que empregam cálice cônico* — Embora descrita como técnica nova por RUGAI, MATOS & BRISOLA [16], esta variante já tinha sido utilizada por BRUG [3]. Êste autor aconselhava colocar 10 g de fezes sôbre um pedaço de pano, fazer um amarrado e suspendê-lo em água contida em um cálice cônico. Após a extração por um período de 60 a 90 minutos, as larvas eram coleta-

das no fundo do cálice com o auxílio de uma pipeta e examinadas entre lâmina e lamínula. Esta técnica ficou ignorada pela generalidade dos pesquisadores e laboratoristas, embora, segundo BIJLMER [2], ela seja largamente usada na Holanda para o diagnóstico da estrongiloidíase. Êsse autor a recomenda como muito eficaz. CHANDLER [4] também aconselha o método de Brug para extração de larvas das fezes.

A técnica descrita por RUGAI, MATOS & BRISOLA [16] é a seguinte: amostras de fezes, contidas na própria latinha em que são enviadas ao laboratório, são cobertas por uma gaze e colocadas em contato com água aquecida a 40-42°C num cálice de sedimentação. Após 60 a 90 minutos colhe-se o sedimento no fundo do cálice com uma pipeta, transferindo-o para um vidro de relógio onde é examinado. Como se pode notar esta técnica é apenas uma ligeira variante da de BRUG [3], conforme já dissemos.

As técnicas em que as fezes são colocadas em contato direto com a água, sem interposição de retalho de tecido, tela metálica ou papel, têm um grave inconveniente, aliás apontado pelos autores que as usaram: as larvas, após a migração para a água muitas vêzes permanecem escondidas sob as fezes e não são encontradas ao exame microscópico.

Por outro lado, as variantes que utilizam o funil, cuja haste é ligada a uma ponta de pipeta por um tubo de borracha ou plástico pinçado com pinça de Mohr oferecem, entre outros, os seguintes inconvenientes: o dispositivo em si é mais complicado e caro; sua lavagem é mais trabalhosa e não permite uma esterilização adequada, a menos que o aparelho seja desmontado depois de cada vez que é usado; o tubo de borracha ou plástico se estraga com o pinçamento e deve ser substituído com freqüência; a colheita das larvas em um vidro de relógio por abertura da pinça de Mohr oferece riscos de contaminar as mãos do operador; durante sua migração, larvas podem ficar retidas nas junções do funil ou da pipeta com o tubo de borracha ou plástico.

Finalmente, as variantes que utilizam cálice cônico requerem que as larvas que se sedimentaram sejam removidas com uma pipeta. Ora por mais cuidadosa que seja a introdução desta no cálice, sempre se produz um turbilhão na água que pode ressuspender larvas; demais, ao se proceder a remoção do sedimento, as larvas podem não ser aspiradas; ainda mais, larvas podem ficar aderentes à parede da pipeta; finalmente a simples necessidade de se usar pipeta é uma etapa adicional a complicar a técnica.

Assim sendo, concluímos que a solução deveria consistir em fazer a extração das larvas no próprio recipiente em que elas devem ser pesquisadas. Já vimos que a técnica da placa de Petri de COUTINHO, CAMPOS & AMATO [7] não é totalmente satisfatória. Tentamos a extração colocando fezes sôbre a tela metálica adaptada diretamente a um vidro de relógio de concavidade e dimensões adequadas, contendo água. Os resultados foram muito bons, mas o vidro de relógio requeria um dispositivo especial para lhe dar estabilidade. Foi quando descobrimos no comércio um tipo de pires de vidro adequado à finalidade.

DESCRIÇÃO DA TÉCNICA

Nosso dispositivo (figs. 1 e 2) requer: a) um pires de vidro Pyrex medindo aproximadamente 9 cm de diâmetro e com uma profundidade de cêrca de 0,9 cm; b) uma peneira constituída por tela de cobre com 1.225 malhas por cm², montada em um aro circular do mesmo material medindo 7 cm de diâmetro e 1 cm de altura, dotado de um cabo para facilitar a manipulação; c) uma tampa de lata com cêrca de 6 cm de diâmetro e munida de orifícios (optativa).

A técnica de operação é a seguinte:

1) Tomar 10 g de fezes homogenizadas e com auxílio de um bastão colocá-las sôbre a peneira e distribuí-las regularmente sôbre a tela metálica, de modo a ocupar uma área de cêrca de 5 cm de diâmetro; em casos de fezes muito endurecidas é conveniente, ao homogenizá-las, juntar um pouco d'água para lhe dar consistência menos firme e facilitar o contato com a tela assim como a saída das larvas.

2) Cobrir as fezes com a tampa furada e adaptar a peneira sôbre o pires.

3) Colocar cuidadosamente água aquecida a 40-45°C no pires, até o nível líquido ultrapassar o do fundo da peneira e deixar a extração se processar durante 60 minutos.

4) Retirar cuidadosamente a peneira e examinar a água do pires ao microscópio entomológico, com objetiva de 4x e ocular 5x. As larvas se coletam de preferência na parte plana mais funda do pires, embora possam ser encontradas próximas da junção da superfície d'água com as bordas do pires.

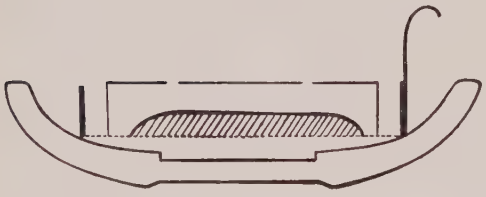

Figura 1

Rugai, Matos & Brisola [16] salientaram que, na latinha fechada, se forma CO_2 que contribui para maior efetividade da técnica, pois as larvas têm tropismo negativo para êste gás. Preferimos, porém, furar a latinha e perder êsse tropismo, se é que existe, mas evitar a formação de uma câmara de ar dentro da latinha, cuja pressão impede a água de penetrar e cobrir as fezes (Ferriolli Filho [8]).

Acontece, às vêzes, que substâncias fecais solúveis ou partículas fecais muito pequenas passam para a água, produzindo turvação e prejudicando a pesquisa direta das larvas no entomológico. Nestes casos, felizmente raros, transferimos o conteúdo do pires para um tubo de centrífuga de 50 ml, centrifugamos durante dois minutos a 1.500 r.p.m. e examinamos o sedimento entre lâmina e lamínula. Não coramos, pois as larvas se conservam móveis e isto facilita o exame.

Após a efetuação dos exames as peças podem ser submetidas à lavagem e esterilização pelo calor, sem perigo de serem danificadas, podendo cada conjunto ser usado indefinidamente.

A técnica acima proposta alia, à sua simplicidade e limpeza, uma eficiência que se comprovou nas comparações a que a submetemos e que serão expostas a seguir.

Figura 2

ESTUDO COMPARATIVO DA EFICIÊNCIA DA TÉCNICA DO PIRES COM A DO MÉTODO DE LOOSS-BAERMANN MODIFICADA

Para esta comparação submetemos amostras de fezes de 89 indivíduos à extração feita simultâneamente pelo método de Looss-Baermann modificado sucessivamente por Moraes [15], Coutinho & col.[6] e Ferriolli Filho [8] e pela técnica acima proposta. Os resultados, obtidos após 60 minutos de extração, são apresentados no quadro I.

QUADRO I

Comparação das técnicas de LOOSS-BAERMANN modificada e do pires em 89 amostras de fezes.

Técnica	Casos positivos	% sôbre o total de positivos	% sôbre o total de examinados
Looss-Baermann	49	92,45	55,06
Pires	50	94,34	56,18
Só Looss-Baermann	3	5,66	3,37
Só pires	4	7,55	4,49
Ambas	46	86,79	51,68
Total	53	—	59,55

Como vemos, pela técnica do pires deixaram de ser revelados 3 casos enquanto que pela técnica de Looss-Baermann modificada não foram revelados 4 casos. Em todos os casos em que ocorreu falha de uma das técnicas tratava-se de material que continha poucas larvas. Não notamos diferenças apreciáveis no número de larvas reveladas por cada técnica e em cada caso.

SUMMARY

A new modification of Looss-Baermann's technique for the extraction of larvae of Strongyloides stercoralis *from stools: the dish technic.*

A new modification of Looss-Baermann's technique for the extraction of larvae of *Strongyloides stercoralis* from stools is described. Stool specimen is placed on a copper-sieve with 1,225 meshes per square centimeter and mounted in a metal ring seven centimeters wide and one centimeter high, having a holder to facilitate manipulation. This sieve is brought into contact with warm water (40-45ºC) contained in a Pyrex dish 9 centimeters in diameter. In order to avoid exposition to air the stool specimen on the sieve is covered with a metal cover having two holes.

After an hour, the sieve is removed and *Strongyloides* larvae are searched in the dish with the aid of a stereoscopic microscope. When small fecal particles and soluble substances pass through the screen and produce a turbidity intense enough to obstruct visualization of larvae, the water is transferred to a test tube and centrifugated at 1,500 r.p.m. for two minutes, and the sediment is examined between slide and cover slip.

This technique is simple, hygienic, and economical, and gives good results. Fifty-three positive specimens examined simultaneously by Looss-Baermann's modified technique as well as by the new one gave substantially the same results, that is, 92.4 per cent and 94.34 per cent of positive cases, respectively.

REFERÊNCIAS

1. BAERMANN, G. — Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) Larven in Erdproben. Mededeel. Geneesk. Lab. Weltevreden, Feestbundel, Batavia. pp. 41-47, 1917.

2. BIJLMER, J. — On the recovery of protozoa and eggs of some species of helminths in human feces. J. Parasitol. **34**:101-107, 1948.

3. BRUG, S. L. — De methode van Baermann toegepast op he onderzoek der faeces op mijnowormeieren. Gen. Tijdeschr. Ned. Indië **61**:565-573, 1921.

4. CHANDLER, A. C. — Modern methods for making fecal examination for helminthic infections. Amer. J. Technol. **17**:64-68, 1951.

5. CORT, W. W.; ACKERT, J. E.; AUGUSTINE, D. L. & PAYNE, F. K. — Investigations on the control of hookworm disease. II. The description of an apparatus for isolating infective hookworm larvae from the soil. Amer. J. Hyg. **2**:1-16, 1922.

6. COUTINHO, J. O.; CAMPOS, R. & AMATO *Neto,* V. — Nota sôbre diagnóstico e prelência da estrongiloidose em São Paulo. Rev. clín. São Paulo **27**:1-10, 1951.

7. COUTINHO, J. O.; CAMPOS, R. & AMATO *Neto,* V. — Nota sôbre a prevalência da estrongiloidíase em crianças de São Paulo. Folia clin. & biol. **17**:191-207, 1951.

8. FERRIOLLI *Fº,* F. — Diagnóstico da estrongiloidíase. Modificações do método de Baermann-Moraes. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo **1**:138-140, 1959.

9. KOLMER, J. A. & BOERNER, F. — Approved laboratory technic. New York, Appleton-Century, 1931.

10. KYLE, L. H.; McCAY, D. G. & SPARLING, H. J. — Strongyloidiasis. Ann. int. Med. **29**:1014-1027, 1948.

11. LEE, C. U. — Some observations on *Strongyloides stercoralis.* Arch. f. Schiffs u. Tropen-Hyg. **34**:262-274, 1930.

12. LEICHTENSTERN, O. — Zur Lebensgeschichte der *Anguillula intestinalis.* Zentralbl. f. Bakt., I. Abt. **25**:226-231, 1899.

13. LEVIN, A. L. — The problem of eradication of *Strongyloides intestinalis.* Amer. J. trop. Med. **10**:353-363, 1930.

14. LOOSS, A. — The anatomy and life-history of *Anchilostoma duodenale* Dub. Monograph. Rec. Egypt. Govt. School Med. **4**:159-613, 1911.

15. MORAES, R. G. — Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrongiloidose no Brasil. Rev. S.E.S.P. **1**: 507-624, 1948.

16. RUGAI, E.; MATTOS, T. & BRISOLA, A. P. — Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes. Modificação do método de Baermann. Rev. Inst. Adolfo Lutz **14**:1-8, 1954.

17. SANDGROUND, J. H. — Some observations on the life-cycle, methods of diagnosis and incidence of *Strongyloides stercoralis* in the tropics. Ann. Rep. United Fruit Co. med. Dept. **14**:240-245, 1925.

18. SIMPSON, V. E. — Strongyloidiasis. J. Amer. med. Ass. **112**:828-833, 1939.

Recebido para publicação em 20 dezembro 1960.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
3(1):15-28, janeiro-fevereiro 1961

CDU 576.893.161.13
:599(81.1)

TRIPANOSOMÍDEOS DE MAMÍFEROS DA REGIÃO AMAZÔNICA

I. Alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres do Estado do Pará

Leonidas M. Deane [1]

RESUMO

O A. vem aproveitando tôdas as oportunidades que se lhe têm oferecido, para estudar hemoflagelados de animais silvestres da Amazônia brasileira. Como as condições de trabalho não têm sido sempre as mesmas, resolveu reunir nesta Nota, os dados que possuía sôbre tripanosomídeos assinalados em 721 mamíferos examinados no Estado do Pará (Quadro 1 e Figuras) e que, embora colhidos entre 1936 e 1938, permaneciam, em grande parte, inéditos. Tais flagelados foram: tripanosomas do tipo *cruzi* nos marsupiais *Didelphis marsupialis* e *Marmosa cinerea*, nos morcegos *Phyllostomus hastatus*, *Mollossus rufus*, *M. obscurus* e de uma espécie indeterminada, em tatus *Dasypus novemcinctus* e em iraras, *Tayra barbara*; tripanosomas do tipo *lewisi* na paca, *Cuniculus paca* e no rato sauiá, *Proechimys guyannensis oris* e um tripanosoma do tipo *heybergi* em morcego de espécie não determinada; *Trypanosoma legeri* no tamanduá *Tamandua tetradactyla*, *T. mazamorum* no veado *Mazama simplicicornis*, *T. devei* no mico *Leontocebus tamarin*, *T. mesnil-brimonti* n. sp. e *Endotrypanum schaudinni* em preguiças *Choloepus didactylus*, além de leishmânias de localização visceral e natureza não esclarecida, no mesmo hospedeiro.

Apresenta o Autor ainda as notas que reuniu sôbre a freqüência do parasitismo, a morfologia, o comportamento em meios de cultura, a infectividade para animais de laboratório e as tentativas de transmissão realizadas com alguns dêsses tripanosomídeos.

INTRODUÇÃO

Temos tido várias oportunidades de examinar mamíferos domésticos e silvestres da Região Amazônica do Brasil na procura de reservatórios de parasitoses humanas. A primeira vez que nos dedicamos a êsse mister foi quando, participando entre 1936 e 1938 da Comissão de Estudos da Leishmaniose Visceral Americana, chefiada por Evandro Chagas, fomos incumbidos da pesquisa de reservatórios do agente etiológico do calazar no interior do Estado do Pará. Mais tarde, trabalhando no Serviço Especial de Saúde Pública (1942 a 1949), no Instituto de Malariologia do Serviço Nacional de Malária (1950 a 1952) e na Faculdade de Medicina de São Paulo (1953 até o presente), fizemos algumas excursões aos Estados e Territórios daquela região, examinando numerosos animais silvestres. Como a finalidade das pesquisas e a técnica de trabalho na primeira ocasião foram diferentes das posteriores, limitaremos esta nota às observações feitas com o material colhido naquela.

Fac. Medicina Univ. São Paulo — Dep. Parasitologia (Prof. A. D. F. Amaral) e Inst. Evandro Chagas (Belém, Pará).

(1) Docente-Livre e Assistente de Parasitologia.

DEANE, L. M. — Tripanosomídeos de mamíferos da Região Amazônica. I. Alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres do Estado do Pará. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 3(1):15-28, 1961.

Alguns de nossos achados dessa época já foram divulgados (DEANE & JANSEN [15]; FERREIRA & DEANE [21]) e nos relatórios anuais da Comissão Chagas (CHAGAS *et al.*[6, 7]) encontram-se referências sôbre parte dos animais examinados; pouco depois, outros membros da Comissão estudaram a infecção de animais silvestres pelo *Trypanosoma cruzi* numa localidade do Pará (RODRIGUES & MELLO [35]). Entretanto, como a maior parte dos dados que obtivemos naquela ocasião permanecem inéditos, decidimos publicá-los agora, a fim de orientar futuros pesquisadores interessados no assunto.

Referências a hemoflagelados de mamíferos da Amazônia são encontradas em uma série de outras publicações: DURHAM, em 1900 (segundo DIAS [18]), menciona a presença de tripanosoma em morcegos; BERENBERG-GOSSLER [3] refere o achado de um tripanosoma que descreve como novo, o *T. prowazecki*, num macaco-cacajão (*Brachyurus calvus*); ABEN-ATHAR [1] e CHAGAS [4, 5] constataram a infecção do macaco-de-cheiro, *Saimiri sciureus*, pelo *T. cruzi;* STRONG, SHATTUCK & WHEELER [36] encontraram o *T. legeri* em tamanduás e tecem extensas considerações sôbre o parasitismo dos cavalos da região pelo *T. equinum*, assunto que foi posteriormente motivo de uma detalhada publicação de JANSEN [26]; DIAS *et al.*[19] estudaram tripanosomas de morcegos e seus transmissores locais; CUNHA & MUNIZ [8] efetuaram investigações sôbre o *Endotrypanum schaudinni* sob os pontos de vista cultural e imunológico; M. P. DEANE [17] assinalou a presença do *T. conorrhini* em "barbeiros" e ratos da cidade de Belém e o cultivou em meio de N.N.N.; DEANE & MARTINS [16] descreveram o *T. diasi*, do macaco-prego *Cebus apella*, e DEANE [12, 13, 14] assinalou o encontro de tripanosomas do tipo *cruzi* no rato d'água *Nectomys squamipes* e na cuíca *Metachirops opossum* e de tripanosomas do tipo *rangeli* neste último hospedeiro e no gambá *Didelphis marsupialis*.

Em sua maioria, os exames de animais constantes desta nota foram feitos pessoalmente por nós, porém alguns foram efetuados pelo próprio Evandro Chagas ou pelos colegas da Comissão, Maria Paumgartten Deane, Gladstone M. Deane, L. de Castro Ferreira, F. Nery Guimarães, G. Jansen e B. Sá.

MATERIAL E MÉTODOS

Os sangues examinados foram obtidos de animais adquiridos para o exame de vísceras visando a procura de eventuais reservatórios silvestres da *Leishmania donovani*. Foram apanhados em focos de calazar ou em suas proximidades, principalmente nos municípios de Abaetetuba, Moju e Igarapé-mirim, situados na Zona Guajarina do Estado do Pará. Poucos animais, principalmente representados por morcegos, vieram de outros municípios do mesmo Estado, como Soure, Marapanim e Curuçá.

Os mamíferos eram ou caçados pelos próprios membros da Comissão ou comprados de caçadores locais, que os apanhavam a tiros ou em armadilhas. Quando os animais chegavam moribundos ou já mortos, colhíamos sempre fragmentos de baço e fígado para confecção de esfregaços e cortes e aproveitávamos para fazer exame do sangue, a fresco e após coloração dos esfregaços pelos métodos de Giemsa ou Leishman. Os animais capturados vivos só eram necropsiados após alguns exames de sangue e uma punção do fígado. Tentativas de cultivo em meios de N.N.N., Noller ou Noguchi e inoculação em outros animais eram feitas sempre que possível. A pele e o crânio dos mamíferos eram remetidos ao Museu Goeldi, no Pará, ou ao Museu Nacional, no Rio de Janeiro, onde sua determinação era feita no primeiro caso pelo Dr. Godofredo Hagmann e no segundo pelo Dr. Alípio de Miranda Ribeiro.

RESULTADOS

O método empregado — exame direto de sangue feito uma ou poucas vêzes — evidentemente só pode revelar uma pequena proporção das infecções; conseqüentemente o número de animais que encontramos infectados deve ser tomado como representando apenas uma fração do real.

Como se vê no Quadro I, examinamos ao todo 721 mamíferos silvestres distribuídos por 40 ou mais espécies pertencentes a 7 ordens. Encontramos hemoflagelados em 47 mamíferos de, pelo menos, 13 espécies.

QUADRO I

Hemoflagelados encontrados pelo exame direto do sangue, em mamíferos silvestres do Estado do Pará, capturados de 1936 a 1938.

ESPÉCIE DE MAMÍFERO		Nº de examinados	NÚMERO DE POSITIVOS PARA *Trypanosoma*							
Nome científico	Nome vulgar		*T. tipo cruzi*	*T. tipo lewisi*	*T. tipo heybergi*	*T. legeri*	*T. mesnil-brimonti*	*T. mazamorum*	*T. devei*	*Endotrypanum schaudinni*
MARSUPIALIA										
Didelphis marsupialis	Mucura	39	2	—	—	—	—	—	—	—
Philander philander	Mucura jupará	5	—	—	—	—	—	—	—	—
Chironectes minimus	Mucura d'água	1	—	—	—	—	—	—	—	—
Marmosa cinerea	Mucura chichica	40	3	—	—	—	—	—	—	—
CHIROPTERA										
Phyllostomus hastatus	Morcego	29	2	—	—	—	—	—	—	—
Tonatia bidens	Morcego	4	—	—	—	—	—	—	—	—
Glossophaga soricina	Morcego	18	—	—	—	—	—	—	—	—
Saccopteryx bilineata	Morcego	1	—	—	—	—	—	—	—	—
Mollossus rufus	Morcego	12	1	—	—	—	—	—	—	—
Mollossus obscurus	Morcego	38	1	—	—	—	—	—	—	—
Eumops abrasus	Morcego	42	—	—	—	—	—	—	—	—
Thyroptera sp.	Morcego	18	—	—	—	—	—	—	—	—
Desmodus rotundus	Morcego	2	—	—	—	—	—	—	—	—
Indeterminada	Morcego	82	1	—	1	—	—	—	—	—
RODENTIA										
Proechimys guyannensis oris	Rato sauiá	105	—	4	—	—	—	—	—	—
Echimys paleacens	Sauiá bandeira	2	—	—	—	—	—	—	—	—
Dasyprocta aguti	Cotia	8	—	—	—	—	—	—	—	—
Cuniculus paca	Paca	8	—	1	—	—	—	—	—	—
Hydrochoerus hydrochoeris	Capivara	1	—	—	—	—	—	—	—	—
Coendu incolor	Coandu	4	—	—	—	—	—	—	—	—
Sciurus sp.	Coatipuru	26	—	—	—	—	—	—	—	—
EDENTATA										
Tamandua tetradactyla	Tamanduá-colête	20	—	—	—	5	—	—	—	—
Cyclopes didactylus	Tamanduá-i	12	—	—	—	—	—	—	—	—
Bradypus tridactylus	Preguiça bentinha	46	—	—	—	—	—	—	—	—
Choloepus didactylus	Preguiça real	25	—	—	—	—	2	—	—	13
Dasypus novemcinctus	Tatu-ête	22	4	—	—	—	—	—	—	—
Cabassous unicinctus	Tatu-de-rabo-mole	5	—	—	—	—	—	—	—	—
CARNIVORA										
Felis pardalis	Gato maracajá	5	—	—	—	—	—	—	—	—
Procyon carcrivorus	Guaxinim	12	—	—	—	—	—	—	—	—
Nasua nasua	Coati	2	—	—	—	—	—	—	—	—
Tayra barbara	Irara	4	2	—	—	—	—	—	—	—
Grison vittatus	Furão	3	—	—	—	—	—	—	—	—
Grammogale africana	Doninha	4	—	—	—	—	—	—	—	—
Pteronura brasiliensis	Ariranha	3	—	—	—	—	—	—	—	—
ARTHIODACTYLA										
Tayassu tajacu	Caetetu	9	—	—	—	—	—	—	—	—
Mazama americana	Veado vermelho	5	—	—	—	—	—	—	—	—
Mazama simplicicornis	Veado	2	—	—	—	—	—	1	—	—
PRIMATES										
Cebus apella	Macaco prego	5	—	—	—	—	—	—	—	—
Saimiri sciureus	Macaco de cheiro	2	—	—	—	—	—	—	—	—
Alouatta belzebul	Guariba	7	—	—	—	—	—	—	—	—
Leontocebus tamarin	Macaco pretinho	43	—	—	—	—	—	—	4	—
TOTAL		721	16	5	1	5	2	1	4	13

Figs. 1 a 35: **1** — Tripanosoma do tipo *cruzi* de *Didelphis marsupialis;* **2** — idem de *Marmosa cinerea;* **3** — idem de *Tayra barbara;* **4-5** — idem de *Phyllostomus hastatus;* **6** — eritrócito de *P. hastatus;* **7-9** — tripanosomas do tipo *cruzi* de *Mollossus rufus;* **10** — eritrócito de *M. rufus;* **11-14** — tripanosomas do tipo *lewisi* de *Cuniculus paca;* **15** — eritrócito de *C. paca;* **16-17** — tripanosomas do tipo *lewisi* de *Proechimys guyannensis oris;* **18** — eritrócito de *P. guyannensis oris;* **19-22** — *Trypanosoma legeri* de *Tamandua tetradactyla;* **23** — eritrócito de *T. tetradactyla;* **24-27** — *Trypanosoma mesnili-brimonti* de *Choloepus didactylus;* **28** — eritrócito de *C. didactylus;* **29** — *Trypanosoma mazamorum* de *Mazama simplicicornis;* **30** — tripanosoma do tipo *heybergi* de morcego indeterminado; **31-35** — *Endotrypanum schaudinni* de *C. didactylus.*

Antes de passarmos aos detalhes concernentes a cada espécie de flagelado, queremos referir que examinamos também o sangue de numerosos animais domésticos da mesma região, sendo 555 cães, 202 gatos, 19 ratos domésticos e 1 cavalo, todos com resultados negativos para hemoflagelados, exceto o cavalo, que estava parasitado pelo *Trypanosoma equinum.*

Trypanosomas do tipo cruzi

Pelo aspecto morfológico das formas sanguícolas os tripanosomas encontrados nos marsupiais, iraras, tatus e morcegos são semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (figs. 1 a 5 e 7 a 9). A questão de sua identidade com o agente etiológico da doença de Chagas ainda não está, entretanto, em todos os casos, suficientemente esclarecida.

Em marsupiais

Durante as pesquisas aqui descritas encontramos tripanosomas do tipo *cruzi* em duas espécies de marsupiais: *Didelphis marsupialis marsupialis* L. e *Marmosa cinerea cinerea* Temminck.

Didelphis marsupialis é um gambá muito comum na região, onde é conhecido por "mucura" ou "mucura branca". De 39 exemplares, 2 mostraram-se positivos pelo exame direto do sangue (fig. 1), sendo estas as observações não publicadas que serviram de base à informação de Rodrigues & Mello [35] sôbre o encontro dêsse marsupial como reservatório do *T. cruzi* na Amazônia, pelo Serviço de Estudo das Grandes Endemias do Instituto Oswaldo Cruz. Aquêles autores, trabalhando num sítio próximo de Belém, examinaram o sangue de 18 *Didelphis* sp. sem achar tripanosomas, porém efetuando o xenodiagnóstico em 12 encontraram 11 positivos. Mais recentemente, procedendo o xenodiagnóstico em animais silvestres do interior dos municípios de Belém e Ananindeua constatamos a infecção por tripanosomas do tipo *cruzi* em 8 dentre 23 *Didelphis marsupialis* examinados e tripanosomas do tipo *rangeli* em 2 (Deane [12]).

Marmosa cinerea é um pequeno marsupial, conhecido na Amazônia como "mucura chichica". Em publicação anterior (Deane & Jansen [15]), assinalamos o encontro de tripanosoma do tipo *cruzi* no sangue de 3 dentre 40 *M. cinerea* provenientes do município de Abaetetuba. Êste tripanosoma mostrou-se infectante para animais de laboratório e para o triatomíneo *Triatoma brasiliensis* (além de um ligeídeo — *Clerada apicicornis*) e foi fàcilmente cultivado em meios de Nöller e Noguchi. Êsses fatos, ao lado do aspecto da forma sanguícola (fig. 2) e do encontro de leishmânias grandes e com cinetoplasta grosseiro em vísceras do hospedeiro natural e dos animais de laboratório, levaram-nos a identificar o tripanosoma em questão ao *T. cruzi.* Recentemente encontramos (Deane [13]) tripanosoma semelhante noutro marsupial do Pará, o *Metachirops opossum.*

Em quirópteros

Segundo Dias [18], a primeira referência sôbre possível parasitismo de morcegos por tripanosomas no estuário do Amazonas deve-se a Durham, que, examinando em 1900 o sangue contido no estômago de um mosquito que havia sugado pouco antes um morcego do gênero *Phyllostomus,* aí encontrou numerosos tripanosomas, que entretanto não descreveu.

Numa excursão feita ao município de Marapanim em abril de 1937, examinamos o sangue de 2 morcegos de espécie não identificada capturados numa palhoça do sítio São Paulo: num dêles encontramos tripanosomas com aspecto de *T. cruzi.* Não achamos leishmânias nos esfregaços de fígado ou baço. Posteriormente, em fevereiro e março de 1938, na cidade de Igarapé-mirim, examinamos 4 *Phyllostomus hastatus,* 5 *Mollossus rufus,* 15 *Mollossus obscurus* e 25 morcegos de espécies indeterminadas: em 2 dos *P. hastatus,* em 1 dos *Mollossus rufus* e em 1 dos *M. obscurus* achamos tripanosomas. O exame das preparações coradas permitiu-nos verificar que os tripanosomas do *M. rufus* (figs. 7 a 9) coincidem, por seu aspecto, com o *T. vespertilionis* descrito por Battaglia [2] em 1904, isto é, são menores que o *T. cruzi* e têm o núcleo situado muito

para frente do meio do corpo. Os flagelados do *Phyllostomus hastatus* (figs. 4 e 5) têm o mesmo aspecto dos tripanosomas observados por Dias & Pifano [20] no *P. elongatum*, sendo muito semelhantes ao *T. cruzi*.

Inoculamos o sangue de um dos *P. hastatus* infectado em 2 camundongos brancos e 1 cobaio, cujo sangue, examinado a fresco, quase diàriamente durante um mês e depois a maiores intervalos, foi negativo até 201 dias transcorridos da inoculação; sacrificados os camundongos, não revelaram parasitos nos esfregaços de fígado, baço, pulmão ou coração. Inoculamos também o sangue do *M. obscurus* positivo em 1 rato branco, 1 cobaio e 1 coelho, cujo sangue mostrou-se negativo até 193 dias depois.

Em 1940, no Pará, Romaña, segundo Dias *et al.*[19], constatou o parasitismo da espécie *Lonchophylla mordax* e Mello, em 1941, o de *Choeronycteris minor*. Posteriormente Dias *et al.*[19], examinando a fresco o sangue de 588 morcegos de 17 espécies capturados na Ilha de Marajó e em Belém, encontraram tripanosomas do tipo *cruzi* em 27 exemplares pertencentes às espécies *Dirias albiventer, Eumops abrasus, Glossophaga soricina, Hemiderma perspicillata, Macronycteris megalotis, Phyllostomus elongatum* e *Saccopteryx bilineata*.

Em troncos de árvores habitados por morcegos acharam triatomíneos da espécie *Cavernicula pilosa*, bem como os percevejos *Latrocimex spectans* e *Cimex limai*, o carrapato *Ornithodoros dunni* e duas espécies de *Streblidae, Aspidoptera megastima* e *Parasyschiria dubia;* sòmente nos *C. pilosa* encontraram critídias e tripanosomas, aliás, semelhantes aos do *cruzi;* informam ter infectado (precàriamente) um morcego, mas não camundongos ou cobaios com o conteúdo intestinal de *C. pilosa* positivos, mencionando ainda ter conseguido infectar morcegos, mas não camundongos, cobaio ou cão em sangue de *H. perspicillata* parasitados. Tentando xenodiagnóstico com outras espécies de triatomíneos (*Triatoma brasiliensis* e *Rhodnius prolixus*) em morcegos positivos, só conseguiram infectar 1 dos 8 "barbeiros" empregados.

Rodrigues & Mello [35], em Aurá, perto de Belém, examinaram o sangue de 39 morcegos não determinados, encontrando 5 positivos, mas o xenodiagnóstico feito em 8, incluindo todos os positivos ao exame direto, foi negativo.

Pensamos que ainda não se dispõe de informações suficientes para estabelecer a posição sistemática dos tripanosomas semelhantes ao *cruzi* que se encontram nas diversas espécies de morcègos, pois os dados dos vários autores não são uniformes quanto aos caracteres morfológicos e biológicos dos parasitos dos diferentes quirópteros. Com base principalmente nos estudos de Dias *et al.*, de Zeledon & Vieto [40, 41] e em nossas próprias observações, pensamos que nesses mamíferos têm sido encontrados:

a) o *T. cruzi*, assinalado em morcegos das áreas endêmicas da doença de Chagas, com cêrca de 20 μ de comprimento, índice nuclear de 1,4 a 1,6, evoluindo bem em "barbeiros" e virulento para animais de laboratório;

b) o *T. vespertilionis* Battaglia, 1904, espécie que seria caracterizada por seu tamanho pequeno, de 14 a 16 μ; seu índice nuclear elevado, de 2,6 a 2,7; seu não desenvolvimento ou evolução difícil nas espécies de triatomíneos que habitualmente veiculam o *T. cruzi* e sua infectividade muito baixa para os animais de laboratório;

c) formas que não podem ser no momento incluídas em nenhuma destas categorias e que precisam ser melhor estudadas.

Em desdentados

Quatro dentre 22 *Dasypus novemcinctus novemcinctus* L. que examinamos apresentaram no sangue tripanosomas indistinguíveis do *T. cruzi* e foram estas verificações que levaram Rodrigues & Mello [35] a referir que anteriormente à sua publicação já fôra constatado, pelo Serviço de Estudo das Grandes Endemias, ser o tatu um dos reservatórios daquele parasito na Região Amazônica. Êsse hospedeiro é conhecido como "tatu-etê", "tatu-verdadeiro" ou "tatu-galinha" e os nossos exemplares foram caçados nos municípios de Abaetetuba, Moju e Igarapé-mirim, provindo do primeiro os exemplares

positivos. Não encontramos formas evolutivas aflageladas nos esfregaços de fígado e baço de três dêstes.

Rodrigues & Mello [35] examinaram com resultado negativo o sangue de 5 tatus de Aurá, porém, submetendo 3 ao xenodiagnóstico, constataram a infecção de um dêles. Os mesmos autores encontraram outro desdentado da região naturalmente parasitado: o tamanduá-colête, *Tamandua tetradactyla* L., do qual examinaram 12 exemplares de Aurá, encontrando 3 positivos tanto ao exame direto como ao xenodiagnóstico. Os 20 tamanduás que examinamos foram negativos para tripanosomas do tipo *cruzi*.

Em carnívoros

Em trabalho anterior (Ferreira & Deane [21]) assinalamos a infecção de um mustelídeo, a irara (*Tayra barbara barbara* L.), mencionando ter achado 2 exemplares positivos dentre 3 examinados. Posteriormente examinamos mais um, negativo. As formas sanguícolas são indistinguíveis do *T. cruzi* (fig. 3) e em esfregaço de baço de uma das iraras achamos leishmânias semelhantes às dêsse flagelado. Obtivemos infecção experimental de 8 espécies de triatomíneos e culturas em meios de N.N.N. e Nöller, tendo os elementos aí observados aspecto idêntico ao do *cruzi*. Com a estirpe da irara infectamos camundongo, cobaio, cão, gato e diversos animais silvestres.

Tripanosomas do tipo lewisi

Assim designamos os flagelados morfològicamente semelhantes ao *Trypanosoma lewisi* (Kent, 1880) do rato doméstico. Perto de 100 espécies de mamíferos já foram encontradas parasitadas por tais tripanosomas, que às vêzes têm sido identificadas ao próprio *T. lewisi*, mas em muitos casos têm recebido nomes específicos, baseados em pequenas diferenças morfológicas e numa aparente especificidade. Uma detalhada discussão do assunto foi recentemente apresentada por Davis [10]. Dada a grande variação morfológica de tripanosomas do tipo *lewisi* encontrados em diferentes exemplares de hospedeiro da mesma espécie e até nas diversas fases da infecção do mesmo hospedeiro, ignora-se a validez de muitas das espécies descritas.

Durante o inquérito aqui tratado encontramos tripanosomas do tipo *lewisi* em duas espécies de roedores, a paca e o "rato sauiá".

Na paca (*Cuniculus paca paca* L.), os flagelados foram achados em 1 dentre 7 exemplares, todos capturados no município de Abaetetuba.

Os tripanosomas (figs. 11 a 14) eram relativamente abundantes no sangue do hospedeiro. São estreitos, de citoplasma pouco vacuolizado e núcleo muito pequeno, estreito, elipsóide, e situado bem anteriormente; o cinetoplasta, afastado da extremidade posterior é bastonóide curto ou arredondado, granular, a membrana ondulante é larga e bem pregueada e o flagelo livre muito longo.

A micrometria de dez exemplares revelou as seguintes dimensões (em micra):

	Méd.	*Máx.*	*Mín.*
Corpo, comprimento	24,6	28,7	22,0
largura	1,9	2,4	1,4
Extremidade posterior ao cinetoplasta	5,8	7,0	4,6
Cinetoplasta, diâmetro	0,5	0,6	0,4
Cinetoplasta ao meio do núcleo	11,7	12,4	10,5
Núcleo	2,1	2,5	1,6
Meio do núcleo à extremidade anterior	5,2	8,1	3,5
Flagelo livre	12,1	13,3	9,8

Tentamos cultivar o parasito em meio de Nöller, sem resultado. Inoculamos subcutâneamente o sangue da paca em: 2 camundongos brancos recém-nascidos, 2 ratos brancos, 2 "ratos sauiás" (*Proechimys* sp.) recém-nascidos, 1 cobaia e 1 cotia (*Dasyprocta* sp.); o exame de sangue dêsses animais, feito repetidamente, por um prazo que variou de 17 dias a 5 meses, foi sempre negativo. Um dos ratos sauiás inoculados foi sacrificado 35 dias depois, sendo seu sangue inoculado em uma paca (*Cuniculus paca*), cujo sangue mostrou-se negativo até a morte do animal, 35 dias depois.

O núcleo pequeno e de localização muito anterior e a aparente especificidade do tripa-

nosoma levam-nos a considerá-lo uma espécie nova, para a qual propomos o nome de *Trypanosoma coutinhoi* n. sp., em homenagem ao Prof. J. O. Coutinho, da Faculdade de Higiene e Saúde Pública de São Paulo, que encontrou o mesmo tripanosoma em pacas de São Paulo e presentemente estuda sua morfologia e biologia, tendo-nos gentilmente mostrado seu material para comparação.

O outro hospedeiro de tripanosomas do tipo *lewisi* que encontramos foi o rato sauiá, *Proechimys guyannensis oris* Thomas, rato-de-espinho que constitui um dos roedores mais encontradiços na área. Os tripanosomas foram achados em 4 dentre 150 exemplares provenientes dos municípios de Abaetetuba e Moju. Eram raros no sangue de todos os ratos parasitados. Suas dimensões são bem menores que as do tripanosoma da paca e seu núcleo, relativamente maior, localiza-se pouco adiante do meio do corpo; o cinetoplasta, arredondado ou em forma de traço, situa-se longe da extremidade posterior que é estreita e pontuda; a membrana ondulante é bem pregueada e o flagelo livre longo (figs. 16 e 17). Medidas de 10 exemplares (em micra):

	Méd.	*Máx.*	*Mín.*
Corpo, comprimento	17,9	21,0	14,1
largura	1,7	2,1	1,4
Extremidade posterior ao cinetoplasta	3,3	3,5	3,2
Cinetoplasta, diâmetro	0,4	0,5	0,4
Cinetoplasta ao meio do núcleo	8,8	9,8	7,7
Núcleo	2,2	2,5	1,8
Meio do núcleo à extremidade anterior	6,0	7,7	3,2
Flagelo livre	10,2	12,3	7,0

Não tivemos oportunidade de tentar culturas. Inoculamos o sangue de 2 animais positivos em 1 camundongo branco, 1 rato branco, 2 cobaios e 2 ratos sauiás; um dêstes últimos morreu, 2 dias após a inoculação. O sangue dos demais foi examinado quase diàriamente, até um período de 13 a 62 dias depois e sòmente o "sauiá", inoculado mostrou-se positivo, do 10.º ao 13.º dia, quando foi necropsiado. Julgamos por isso tratar-se de um tripanosoma próprio do rato sauiá, propondo-lhe o nome de *Trypanosoma renjifoi* n. sp., em homenagem ao Prof. Santiago Renjifo, que assinalou na Colômbia (Renjifo & Uribe [33]) um tripanosoma semelhante em rato do mesmo gênero, *Proechimys oconnelli.*

Trypanosoma sp., do tipo *heybergi*

No sangue de um morcego frugívoro de espécie indeterminada, capturado no Igarapé Cupuaçu, município de Abaetetuba, encontramos um único exemplar de tripanosoma grande, largo, de núcleo pequeno, arredondado, localizado adiante do meio do corpo, cinetoplasta pequeno, redondo, situado longe da extremidade posterior, membrana ondulante larga e bem pregueada, flagelo livre curto (fig. 30). Difere assim fàcilmente dos tripanosomas de morcegos referidos atrás, filiando-se ao grupo *megadermae*, de Dias [18] e sendo parecido com o *Trypanosoma heybergi* descrito por Rodhain [34] para o morcego *Nycteris hispidus* do Congo, mas diferindo porque no último o cinetoplasta ocupa uma posição marginal, o núcleo é muito pequeno e o flagelo livre ausente ou curto.

Posteriormente, no Pará, em 1940, Romaña (segundo Dias *et al.*[19]) encontrou tripanosoma do grupo *megadermae* no morcego *Desmodus rotundus rotundus* e Dias *et al.*[19] os assinalaram nos morcegos *Hemiderma perspicillata* e *Glossophaga soricina.*

Trypanosoma legeri Mesnil & Brimont, 1910

Dos 20 "tamanduás colête" (*Tamandua tetradactyla* L.) que examinamos, todos capturados no município de Abaetetuba, 5 mostraram-se positivos para tripanosomas cujo aspecto (figs. 19 a 22) corresponde às descrições e figuras do *T. legeri* dadas por Mesnil & Brimont [31] e por Strong *et al.*[36]. Os parasitos apresentavam nítida variação de tamanho, com predominância das formas grandes: em 24 exemplares, 15 eram da forma grande, 5 da pequena e os 4 restantes de dimensões intermediárias. Os resultados da micrometria que efetuamos nas formas grandes e nas pequenas foram os seguintes (em micra):

	Dimensões médias		*Dimensões máximas*	*Dimensões mínimas*
	Formas grandes	*Formas pequenas*		
Corpo, comprimento	32,8	22,2	39,0	20,4
largura	4,6	3,7	7,2	3,6
Extremidade posterior ao cinetoplasta	13,1	7,3	16,8	6,0
Cinetoplasta	0,5	0,5	0,8	0,4
Cinetoplasta ao meio do núcleo	13,9	9,5	14,2	8,5
Núcleo	3,8	3,4	4,8	2,4
Meio do núcleo à extremidade anterior	5,2	4,1	8,4	2,0
Flagelo livre	9,9	8,2	12,0	6,0

As formas grandes (figs. 19 a 21) têm a extremidade posterior gradualmente afilada e a anterior mais bruscamente estreitada. O citoplasma, nas preparações coradas, é intensa mas irregularmente azul, com vacúolos de limite impreciso localizados principalmente atrás do núcleo e junto ao cinetoplasta; o citoplasma mostra ainda, às vêzes, estrias longitudinais e finos grânulos vermelhos, mais abundantes na porção posterior. O núcleo, situado aquém do meio do corpo, arredondado, elipsóide ou reniforme, cora-se em lilás. O cinetoplasta é granular ou bastonóide, situado geralmente muito longe da extremidade posterior, às vêzes quase no meio do corpo, mais perto do núcleo; a membrana ondulante é muito pregueada e o flagelo livre longo e terminando numa dilatação.

As formas pequenas (fig. 22) que estamos atribuindo à mesma espécie de tripanosoma, são proporcionalmente mais largas que as formas grandes e de cinetoplasta em geral mais próximo da extremidade posterior, núcleo quase do tamanho das formas grandes e, portanto, proporcionalmente maior.

Vimos ainda formas intermediárias quanto ao tamanho, porém assemelhando-se às formas grandes, exceto pela posição mais posterior do cinetoplasta.

Tentamos cultivar o flagelado semeando sangue em meios de N.N.N. e de Nöller, com resultado negativo. Inoculamos o sangue do tamanduá em 2 camundongos brancos, 2 ratos brancos, 1 cobaio, 1 coelho e 1 tamanduá da mesma espécie e injetamos o sangue de outro tamanduá positivo em 1 cão, 1 gato e 1 rato sauiá (*Proechimys* sp.); o exame de sangue dos animais inoculados, feito quase diàriamente por um período de 3 a 9 semanas, foi sempre negativo, exceto o do tamanduá, que revelou tripanosomas em 6 dos exames procedidos; êsse animal tivera o sangue negativo no dia de sua captura e no da inoculação, porém não estamos seguros de que êle tivesse contraído a infecção após a inoculação, dada a infreqüência de positividade dos exames posteriores e a escassez dos flagelados encontrados nesses exames.

O *T. legeri* foi primeiro encontrado por Mesnil & Brimont [31], no sangue de um tamanduá "bandeira", *Tamandua tridactyla* (= *Myrmecophaga tridactyla* L.) da Guiana Francesa; aquêles autores observaram formas grandes e formas pequenas e ressaltaram sua grande largura, o plissado da membrana ondulante e o volumoso cinetoplasta; mencionaram ainda a presença de um nódulo na extremidade livre do flagelo; não viram formas a fresco nem tiveram oportunidade de tentar o cultivo ou inocular o parasito em animais. Posteriormente, em 1926, Strong, Shattuck & Wheeler [36], em excursão que fizeram à Amazônia brasileira, encontraram o mesmo tripanosoma num tamanduá "colête", *Tamandua tetradactyla* L., capturado em lugar não mencionado. Salientaram a raridade dos flagelados no sangue e sua provável inocuidade para o hospedeiro e descreveram-no a fresco e em preparações coradas; semearam o sangue do tamanduá em meio de N.N.N., com resultado negativo e o inocularam em camundongo, cobaios e coelho sem conseguir a infecção dêstes animais.

Em 1941, Floch, Lajudie & Abonnenc [25] descreveram de um *Myrmecophaga tridactyla* da Guiana Francesa um tripanosoma que verificaram evoluir em "barbeiros" e que denominaram *T. myrmecophagae*, com as mesmas dimensões das formas grandes do

T. legeri, mas, segundo os autores, diferindo pelo menor pregueamento da membrana ondulante e ausência de dilatação na ponta livre do flagelo. Posteriormente, FLOCH & ABONNENC [23] consideraram as critídias e formas metacíclicas do *T. myrmecophagae* nos triatomíneos muito parecidas com as de *T. rangeli* Tejera, 1920. Mais tarde, os mesmos autores (FLOCH & ABONNENC [22]) não negam a possibilidade de ser o primeiro sinônimo do último, do que discorda ZELEDON [40], segundo o qual o tamanho maior do *T. myrmecophagae* é caráter distintivo suficiente.

Recentemente, na Costa Rica, TREJOS & MONTERO-GEI [37] encontraram noutro desdentado, a preguiça (*Bradypus griseus*), um tripanosoma que identificaram ao *T. legeri*.

Trypanosoma mesnil-brimonti n. sp.

Examinando o sangue de 25 preguiças "reais" (*Choloepus didactylus* L.), achamos em duas delas o tripanosoma que MESNIL & BRIMONT [30] descreveram em 1908 para êsse mesmo hospedeiro, na Guiana Francesa. Êsses autores encontraram um único exemplar do flagelado, apresentando uma figura do mesmo e mencionando que media 36 μ de comprimento, sendo 12 μ para o flagelo livre; tinha o cinetoplasta a 7 ou 8 μ da extremidade posterior bastante longa e relativamente espêssa, sendo a membrana ondulante pouco desenvolvida; afirmaram, então, não ter razão no momento para supor uma relação genética entre êsse tripanosoma e o *Endotrypanum schaudinni*, que nessa ocasião descreveram para o mesmo hospedeiro.

Os demais autores que examinaram preguiças didáctilas (DARLING [9], LABERNADIE & HUBAC [27], WENYON & SCOTT [39], CUNHA & MUNIZ [8], FLOCH & ABONNENC [24], TREJOS & MONTERO-GEI [37] e MONTERO-GEI [32]) não encontraram tripanosomas em seu sangue, embora, com exceção de FLOCH & ABONNENC. tenham achado o *Endotrypanum*.

Como a descrição e o desenho dados por MESNIL & BRIMONT baseiam-se num único exemplar, redescreveremos aqui o flagelado, com base nos 30 exemplares que nos foi possível observar.

Nossas preguiças positivas foram capturadas em Piratuba, município de Abaetetuba e Utinga, município de Belém.

Os tripanosomas (figs. 24 a 27) são grandes, de núcleo situado um pouco para frente do meio do corpo, cinetoplasta longe da extremidade posterior, que é pontuda, flagelo livre longo; apenas num exemplar observamos uma dilatação na ponta do flagelo. As medidas efetuadas em 10 exemplares foram as seguintes (em micra):

	Méd.	*Máx.*	*Mín.*
Corpo, comprimento	26,2	30,8	22,1
largura	2,2	2,6	2,1
Extremidade posterior ao cinetoplasta	9,1	10,5	6,1
Cinetoplasta, diâmetro	0,7	1,0	0,5
Cinetoplasta ao meio do núcleo	8,1	9,0	7,5
Núcleo	2,5	2,5	2,3
Meio do núcleo à extremidade anterior	9,0	10,5	7,0
Flagelo livre	8,2	9,8	7,7

WENYON [38] refere que êste tripanosoma talvez seja idêntico ao *T. legeri* e recentemente TREJOS & MONTERO-GEI [37] encontraram um tripanosoma que identificaram ao *T. legeri* numa preguiça tridáctila (*Bradypus griseus*) da Costa Rica. A nosso ver, entretanto, o tripanosoma da preguiça didáctila distingue-se do *T. legeri* por ser menor, bem mais estreito e ter o núcleo menos anterior.

O nome que aqui para êle propomos constitui uma homenagem aos pesquisadores franceses que o descobriram.

Trypanosoma mazamorum Mazza, Romaña & Fiora, 1932

No sangue de um dos dois veados da espécie *Mazama simplicicornis simplicicornis* (Illinger) que examinamos de Piratuba, município de Abaetetuba, encontramos tripanosomas grandes, de núcleo submediano, cinetoplasta pequeno, redondo, muito afastado da extremidade posterior que é afilada, membrana ondulante bem pregueada e flagelo livre relativamente curto (fig. 29). A micrometria de seis exemplares revelou (em micra):

	Máximo	*Mínimo*
Corpo, comprimento	75,0	51,0
largura	7,0	6,5
Extremidade posterior ao cinetoplasta	20,0	13,0
Cinetoplasta	0,5	0,5
Cinetoplasta ao meio do núcleo	12,0	8,0
Núcleo	5,0	4,0
Meio do núcleo à extremidade anterior	38,0	25,0
Flagelo livre	10,0	7,0

Estamos provisòriamente identificando êste flagelado ao *T. mazamorum* descrito na Argentina [29], onde foi encontrado nos veados *Mazama rufa toba* e *M. nemerivagus*. A julgar, entretanto, pelas medidas e ilustrações apresentadas pelos autores da espécie, os nossos exemplares parecem diferir por serem maiores, terem o cinetoplasta mais afastado da extremidade posterior e o flagelo livre mais curto. Parecem-nos todavia necessário estudos adicionais para estabelecer a identificação correta do tripanosoma do *M. simplicicornis*.

Trypanosoma devei Leger & Porry, 1918

Esta espécie foi descrita em um mico calitriquídeo, "singe tamarin", *Midas midas* (?), da Guiana Francesa, espécie afim do nosso *Leontocebus tamarin* (Link), conhecido como macaco "pretinho" ou "sauim" e que é o primata mais encontradiço nas matas de Abaetetuba e Moju, onde foram capturados os 43 exemplares que examinamos. Em 4 dêstes encontramos tripanosomas, mas a proporção de infectados deve ser bem maior, pois os flagelados eram tão escassos no sangue dos animais positivos que sòmente em um dêstes conseguimos encontrar exemplares nas preparações coradas; nos restantes só vimos os parasitos a fresco. O aspecto do tripanosoma coincide com o descrito pelos autores da espécie. É longo e muito estreito, com o núcleo elipsóide situado na metade anterior do corpo e tomando tôda a largura dêste a seu nível, cinetoplasta bastonóide, situado longe da extremidade e perto do núcleo, flagelo livre bem desenvolvido. As medidas dos dois exemplares corados foram (em micra):

	Exemplar I	*Exemplar II*
Corpo, comprimento	36,0	38,5
largura	2,0	2,5
Extremidade posterior ao cinetoplasta	15,0	16,5
Cinetoplasta ao meio do núcleo	5,8	6,3
Núcleo	3,5	3,5
Meio do núcleo à extremidade anterior	15,2	15,2
Flagelo livre	6,5	7,0

Leger & Porry [28] afirmam ser o *T. devei* muito parecido com o tripanosoma da preguiça "real", porém pelos nossos exemplares êle é muito mais fino. Segundo aquêles autores, o *T. devei* é inofensivo para o mico, pois o hospedeiro viveu em seu laboratório por mais de 3 anos. Mais recentemente, Floch & Abonnenc [24], comentando os tripanosomas que encontraram no sangue de cinco dentre oito "tamarins", consideram os flagelados de dois dêles semelhantes ao *T. devei* e os restantes diferentes.

Endotrypanum schaudinni Mesnil & Brimont, 1908

Encontramos êste interessante flagelado (figs. 31 a 35) no sangue de 13 dentre 25 preguiças "reais" (*Choloepus didactylus didactylus* L.) provenientes dos municípios de Abaetetuba e Moju.

Êste parasito endoeritrocítico, descoberto por Mesnil & Brimont [30] na Guiana Francesa, foi reencontrado por Darling [9] no Panamá, por Labernadie & Hubac [27] na Guiana Francesa, por Wenyon & Scott [39] em preguiças do Brasil mortas no Zoo de Londres, por Cunha & Muniz [8] no Pará e por Trejos & Montero-Gei [37] e Montero-Gei [32] na Costa Rica. O material estudado por Cunha & Muniz foi obtido à época em que efetuávamos no Pará as observações aqui relatadas. Todos êsses investigadores evidenciaram o endotripano na *Choloepus didactylus*, exceto Trejos & Montero-Gei [37], que o assinalaram noutra preguiça didáctila, a *Choloepus hoffmanni* e também numa preguiça tridáctila, *Bradypus griseus griseus* (Gray).

Em nossas observações, o parasito era quase sempre muito escasso e seus aspectos

morfológicos coincidem com os descritos pelos primeiros pesquisadores que o estudaram. No sangue recentemente obtido é um flagelado intra-eritrocítico, não encontrado em outras células. Decorridos alguns minutos da colheita começam a observar-se formas exo-eritrocíticas (fig. 35), cuja proporção aumenta à medida que o tempo passa — fato assinalado desde DARLING e confirmado recentemente por MONTERO-GEI [32].

A grande maioria dos flagelados que vimos nas hemácias eram critídias, sendo raras as formas com cinetoplasto situado por trás do núcleo, isto é, em tripanosoma. Isso coincide com as observações de quase todos os outros pesquisadores, exceto MONTERO-GEI [32], em cujo material as formas predominantes nas hemácias são descritas como tripanosomas. Nunca vimos endotripanos em divisão.

Cultivamos fàcilmente o parasito em meios de Nöller, Noguchi e N.N.N.

Partindo de culturas, não conseguimos infectar camundongos ou ratos brancos normais ou esplenectomizados, um cão e um macaco *rhesus*.

Em 5 das preguiças "reais" que examinamos, encontramos leishmânias nas vísceras; 3 eram também portadoras de endotripanos e 1 de endotripanos e tripanosomas; na quinta preguiça com leishmânias não encontramos quer endotripanos quer tripanosomas. As leishmânias eram indistinguíveis das causadoras das leishmanioses humanas, sendo diferentes da *L. enriettii* e das formas leishmanióides do *Trypanosoma cruzi*. Conforme já assinalamos (DEANE [11]), ignoramos o significado das leishmânias observadas nas preguiças "reais": se constituem espécie do gênero *Leishmania* ou se representam fase evolutiva de uma ou ambas as demais formas de tripanosomídeos encontradas no mesmo hospedeiro.

Tentando esclarecer a transmissão de *E. schaudinni*, dissecamos 2 carrapatos *Amblyomma geayi* encontrados numa preguiça parasitada, não encontrando flagelados em seu interior. Em laboratório, ou levando uma preguiça infectada para a floresta do Alto da Tijuca (Rio de Janeiro), expusemos o desdentado à picada de vários insetos: hemípteros triatomídeos das espécies *Panstrongylus megistus, P. geniculatus, Triatoma brasiliensis, T. sordida;* hemípteros ligeídeos *Clerada apicicornis*, de hábitos hematófagos; mosquitos, como *Anopheles argyritarsis, Culex* sp., *Aedes scapularis, Psorophora cingulata* e *Phoniomyia pilicauda* e tabânidas da espécie *Dichelacera januaria*. Em *Culex* sp. e *Aedes scapularis* conseguimos a sobrevivência do flagelado até 48 horas após o repasto e em *Dichelacera januaria* até 84 horas, pelo menos. Ignoramos, entretanto, qual o vetor de *Endotrypanum schaudinni* na natureza.

SUMMARY

Mammalian Trypanosomidae *from the Amazon Region of Brazil. I. Some hemoflagellates found in wild mammals from the State of Pará.*

While searching for reservoir hosts of kala-azar, the Author examined blood, liver and spleen smears of 721 wild mammals from the State of Pará, Brazil, and found the various hemoflagellates referred in the present paper (Table 1 and figures). *Cruzi*-like trypanosomes were found in marsupials, *Didelphis marsupialis* and *Marmosa cinerea;* in bats, *Phyllostomus hastatus, Mollossus rufus* and *M. obscurus;* in the armadillo *Dasypus novemcinctus;* and in the ferret *Tayra barbara*. *Lewisi*-like trypanosomes were encountered in two species of rodents, the paca *Cuniculus paca* and a spiny-rat, *Proechimys guyannensis oris*. A *heybergi*-like trypanosome was detected in a bat. Other flagellates found were: *Trypanosoma legeri,* in the ant-eater *Tamandua tetradactyla; T. mazamorum,* in the deer *Mazama simplicicornis; T. devei,* in the marmoset *Leontocebus tamarin; T. mesnil-brimonti* n. sp. in the two-toed sloth *Choloepus didactylus* and *Endotrypanum schaudinni* and leishmania bodies of uncertain systematic position in this last host.

Notes on the prevalence and morphology of the parasites as well as on the behaviour of some species in culture media, laboratory animals and arthropods are also given.

REFERÊNCIAS

1. ABEN-ATHAR, J. — Primeiro anno de funccionamento do Instituto de Hygiene de Belem. (*In* H. C. SOUZA ARAUJO — A prophylaxia rural no Estado do Pará. Livr. Gillet, 1922).

2. BATTAGLIA, M. — Alcune richerche sopra due Tripanosomi (*Trypanosoma vespertilionis, Trypanosoma lewisi*). Ann. Med. nav. **10**:517, 1904.

3. BERENBERG-GOSSLER, H. — Über ein neuer Trypanosome im Blute eines südamerikanischen Affen (*Onakaria calva*). Archiv. f. Schiffs u. Tropen-Hyg. **12**:541, 1908.

4. CHAGAS, C. — Infection naturelle des singes du Pará (*Chrysothrix sciureus*) par *Trypanosoma cruzi*. C. R. Soc. Biol. **90**:873-876, 1924.

5. CHAGAS, C. — Sôbre a verificação do *Trypanosoma cruzi* em macacos do Pará (*Chrysothrix sciureus*). Sciencia méd. **2**:75-76, 1924.

6. CHAGAS, E.; CUNHA, A. M.; CASTRO, G. O.; FERREIRA, L. C. & ROMAÑA, C. — Leishmaniose visceral americana (nova entidade mórbida do homem na América do Sul). Relatório dos trabalhos realizados pela Comissão Encarregada do Estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1936. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **32**:321-385, 1937.

7. CHAGAS, E.; CUNHA, A. M.; FERREIRA, L. C.; DEANE, L.; DEANE, G.; GUIMARÃES, F. N.; PAUMGARTTEN, M. J. & SÁ, B. — Leishmaniose Visceral Americana (Relatório dos trabalhos realizados pela Comissão Encarregada do Estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1937). Mem. Inst. Oswaldo Cruz **33**:89-229, 1938.

8. CUNHA, A. M. & MUNIZ, J. — Pesquisas sôbre o *Endotrypanum schaudinni* Mesnil & Brimont, 1908, parasita do *Choloepus didactylus* (L.). Mem.Inst. Oswaldo Cruz, **41**: 179-194, 1944.

9. DARLING, S. T. — The Endotrypanum of Hoffman's sloth. J. med. Res. **31**:195-203, 1914.

10. DAVIS, B. S. — Studies on the trypanosomes of some California mammals. Univ. California Publ. Zool. **57**:145-250, 1952.

11. DEANE, L. M. — Comentário ao trabalho de C. A. Hoare (The relationship of the Haemoflagellates). Proc. 4th Internat. Congress trop. Med. & Malaria **2**:1117, Washington, 1948.

12. DEANE, L. M. — Encontro de tripanossomo do tipo *rangeli* em gambás da espécie *Didelphis marsupialis marsupialis*, no Estado do Pará. Rev. brasil. Malariol. & Doenças trop. **10**:451-458, 1958.

13. DEANE, L. M. — Novo hospedeiro de tripanossomos dos tipos *cruzi* e *rangeli* encontrado no Estado do Pará: o marsupial *Metarchirops opossum opossum*. Rev. brasil. Malariol. & Doenças trop. **10**:531-541, 1958.

14 DEANE, L. M. — Sôbre um tripanossomo do tipo *cruzi* encontrado num rato silvestre, no Estado do Pará. Rev. brasil. Malariol. & Doenças trop. **11**, 1960. [no prelo]

15. DEANE, L. & JANSEN, G. — Encontro do *Schizotrypanum cruzi* (Chagas, 1909) em marsupiais da espécie *Marmosa cinerea* Desmarest. Brasil-méd. **53**:265-266, 1939.

16. DEANE, L. M. & MARTINS, R. — Sôbre um tripanosoma encontrado num macaco da Amazônia e que evolui em triatomídeos. Rev. brasil. Malariol. & Doenças Trop. **4**: 47-61, 1952.

17. DEANE, M. P. — Ocorrência do *Trypanosoma conorrhini* em "barbeiros" e em rato na cidade de Belém, Pará, e seu cultivo em meio de N.N.N. Rev. S.E.S.P. **1**:433-448, 1947.

18. DIAS, E. — Revisão geral dos hemoflagelados dos Chiropteros. Estudo experimental do *Schizotrypanum* de *Phyllostomus hastatus*: identidade com o *Schizotrypanum cruzi*. O grupo *vespertilionis*. Reunión Soc. argent. Pat. reg. Norte, 9ª, 1935, p. 10-88.

19. DIAS, E.; MELLO, G. B.; COSTA, O.; DAMASCENO, R. & AZEVEDO, M. — Investigações sôbre esquizotripanose de morcegos no Estado do Pará; encontro do "barbeiro" *Cavernicola pilosa* como transmissor. Rev. brasil. Biol. **2**:103-110, 1942.

20. DIAS, E. & PIFANO, F. — Sôbre um *Schizotrypanum* do morcego *Phyllostomus elongatum* da Venezuela. Rev. brasil. Biol. **2**:95-97, 1942.

21. FERREIRA, L. C. & DEANE, L. — Novo depositário silvestre do *Schizotrypanum cruzi* (Chagas, 1909): a irara, *Tayra barbara* L. Brasil-méd. **52**:1159-1161, 1938.

22. FLOCH, H. & ABONNENC, E. — Sur la nouvelle trypanosomiase humaine américaine. Inst. Pasteur Guy. Terr. l'Inini, publ. nº 194, 1949.

23. FLOCH, H. & ABONNENC, E. — Trypanosome de *D. marsupialis* dont les formes metacycliques réssemblent à celles de *T. myrmecophagae*. Inst. Pasteur Guy. Terr. l'Inini, publ. nº 171, 1948.

24. FLOCH, H. & ABONNENC, E. — Trypanosomes des mammifères sylvestres, autres que

S. cruzi, en Guyanne Française. Inst. Pasteur Guy. & Terr. l'Inini, publ. nº 193, 1949.

25. FLOCH, H.; LAJUDIE, P. & ABONNENC, E. — Un trypanosome d'un édenté (*Myrmecophaga tridactyla*) susceptible d'évoluer dans le tube digestif de *Rhodnius prolixus*. Ins. Pasteur Guy. Terr. l'Inini, publ. nº 25, 1941.

26. JANSEN, G. — Contribuição ao estudo do mal de cadeiras na Ilha de Marajó. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **36**:347-367, 1941.

27. LABERNADIE, V. G. & HUBAC, F. — Sur l'*Endotrypanum schaudinni* de l'unau, édenté de la Guyane (*Choloepus didactylus*). C. R. Soc. Biol. **88**:664-666, 1923.

28. LEGER, M. & PORRY, E. — Trypanosomes nouveau de deux singes de la Guyane Française. C. R. Soc. Biol. **81**:180-183, 1918.

29. MAZZA, S.; ROMAÑA, C. & FIORA, A. — Algunos hemopárasitos de mamíferos del norte. Reunión Soc. argent. Patol. reg. Norte, 7ª, 1932, p. 990-997.

30. MESNIL, F. & BRIMONT, E. — Sur un hematozoaire nouveau (*Endotrypanum* n. gen.) d'un édenté de la Guyane. C. R. Soc. Biol. **65**:581, 1908.

31. MESNIL, F. & BRIMONT, E. — Trypanosome et microfilaire d'un édenté, le *Tamandua tetradactyla* (L.). C. R. Soc. Biol. **69**: 148-151, 1910.

32. MONTERO-GEI, F. — Contribución al estudio de *Endotrypanum schaudinni* (*Trypanosomidae*). Rev. Biol. trop., Costa Rica **4**:41-68, 1956.

33. RENJIFO, S. & URIBE, C. — Contribución al estudio de trypanosomas humanos y de animales en Colombia. III. Trypanosomas de vertebrados. Bogotá, Impr. Banco Republ., 1955.

34. RODHAIN, J. — Trypanosome d'un cheiroptère insectivore *Nycteris hispida* Schreber au Congo Belge. Bull. Soc. Pathol. éxot. **16**:659-663, 1923.

35. RODRIGUES, B. A. & MELLO, G. B. — Contribuição ao estudo da tripanosomíase americana. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **37**: 77-90, 1942.

36. STRONG, R. P.; SHATTUCK, G. C. & WHEELER, R. E. — Medical report of the Hamilton Rice 7th Expedition to the Amazon, in conjunction with the Department of tropical medicine of Harvard University, 1924-1925. Cambridge, Harvard Univ. press, 1926.

37. TREJOS, A. & MONTERO-GEI, F. — Estúdios sobre tripanosómidos de Edentata en Costa Rica. I. *Trypanosoma legeri* en *Bradypus griseus griseus*. Rev. Biol. trop., Costa Rica **1**:21-27, 1953.

38. WENYON, C. M. — Protozoology. London, Baillière, Tindall & Cox, 1926.

39. WENYON, C. M. & SCOTT, H. H. — Endotrypanum schaudinni in the two-toed sloth. Tr. R. Soc. trop. Med. & Hyg. **29**:280-281, 1925.

40. ZELEDON, R. & VIETO, P. L. — Comparative studies of *Schizotrypanum cruzi* Chagas, 1909 and *S. vespertilionis* (Battaglia, 1904) from Costa Rica. J. Parasitol. **44**:499-502, 1958.

41. ZELEDON, R. & VIETO, P. L. — Hallazgo de *Schizotrypanum vespertilionis* (Battaglia, 104) en la sangre de murcielagos de Costa Rica. Rev. Biol. trop., Costa Rica **5**:123-128, 1957.

Recebido para publicação em 31 janeiro 1961.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
3(1):29-30, janeiro-fevereiro 1961

CDU 616.995.132.8-085
:547.861.3

TREATMENT OF ASCARIASIS WITH PIPERAZINE AND A SURFACTANT AGENT

Francisco Biagi F., Faustino Navarrete and Alfonso Martuscelli Q.

SUMMARY

146 ascariasis cases were given single-dose treatments of piperazine, and piperazine with tyloxapol.

Results showed that the combination of piperazine with tyloxapol was significantly effective against ascarides.

INTRODUCTION

Salts of piperazine were first used for the treatment of ascariasis by Fayard, in 1949; it has later been proved that these compounds produce the best results in ascariasis therapy [4, 5, 6, 10].

Different Authors referred to the possibility of obtaining satisfactory results with the administration of a single dose of piperazine (Atchley, Wysham & Hemphill [1]; Brown [4]; Fernández de Castro [7]; Fields, Selly & Guicherit [8], Tarnay *et al.*[11]). Other drugs have not proved satisfactory when given in a single dose (Hoekenga [9]).

There is no doubt about the advantages of a single-dose treatment, for it rules out failure to follow through with therapy, and makes mass treatment possible.

Evidence has been obtained recently in favor of the belief that infectivity of *Ascaris* eggs in the soil decreases rapidly under natural conditions (Biagi & Rodríguez [3]). If new contamination could be avoided for some time, by mass treatment of the population, eradication of ascariasis might be accomplished. Hence the need for a highly efective drug for single-dose treatment.

The addition of a surfactant agent to piperazine was designed to favor penetration of the drug into the worms. The purpose of this study is to find out if the vermifuge effect of piperazine increased when a surfactant is added to the medication.

MATERIAL AND METHODS

146 treatments were given to 134 ascariasis patients of different age groups, as shown in Table I. A single dose of 100 mg of piperazine per kg bodyweight, and not exceeding 4 gm was administered orally in the form of a syrup (100 mg piperazine hexahydrate per cc). In 63 cases piperazine * was used alone, and in 83 tyloxapol * was added to the syrup (2 mg tyloxapol for each cc of syrup). No laxatives were given, no special diets followed.

TABLE I

Number and age of patients.

Age	No. of persons
6 — 23 months	10
2 — 6 years	49
7 — 14 years	65
Adults	4
Uncontrolled	6

Therapeutic results were evaluated in each case by three parasitoscopic examinations of the feces with egg counts before the

Sección de Parasitología — Unidade de Patologia, Escuela de Medicina, U. N. A. M., Hospital General, México, D.F.

* Bryrel, and Bryrel with Superinone, Winthrop Products Inc.

treatment, and three examinations 8 days after the treatment. The Ferreira (BIAGI & GONZÁLEZ [2]) method was used for the egg counts, and the "double blind" procedure was followed in the management of patients, drugs and stool samples, in order to avoid subjective errors on the part of the investigator.

Results were based on the average of ascaris eggs per gram of feces (e.g.f.) before and after the treatment. The percentage of decrease in number of eggs (↓ %) shows the therapeutic result of each treatment. A complete eradication corresponds to ↓ 100%.

RESULTS AND COMMENTS

Table II shows the number and percentage of cases in which different degrees of parasite reduction was obtained, from an elimination of approximately one third of the parasites (0-39% ↓), to total clearance.

TABLE II

Effectiviness of piperazine alone and piperazine with a surfactant agent in ascariasis.

% ↓ *	Piperazine (63 cases)		Piperazine plus Tyloxapol (83 cases)	
	No.	%	No.	%
0 — 39	8	12.7	9	10.8
40 — 69	4	6.4	2	2.4
70 — 100	51	80.9	72	86.8
100	41	65.0	67	80.7

* Percentage of the decrease in the number of eggs per gram of feces after treatment.

It is quite evident that piperazine with tyloxapol produces better results; the superiority of this combination is more evident in the group that obtained parasitologic cure, showing a significant statistical diference (P 0.05). We cannot explain the mechanism by which tyloxapol increases the effect of piperazine, but it might be by favoring penetration of the drug into the parasite.

No signs of intolerance were observed. Children accepted the syrup willingly.

RESUMO

Tratamento de ascaridíase com piperazina e um agente detergente.

146 casos de ascaridíase foram tratados com dose única de piperazina, e piperazina + tyloxapol.

Os resultados demonstraram que a combinação piperazina + tyloxapol é significativamente eficiente no combate aos *Ascaris*.

REFERENCES

1. ATCHLEY, F. O.; WYSHAM, D. N. & HEMPHILL, E. C. — Mass treatment of ascariasis with a single dose of piperazine citrate. Amer. J. trop Med. & Hyg. **5**:881-887, 1956.
2. BIAGI-F., F. & GONZÁLEZ, C. — Estudio de métodos para el recuento de huevos en materia fecal. Rev. latinoamer. Microbiol. **2**:51-62, 1959.
3. BIAGI-F., F. & RODRÍGUEZ, O. — A study of ascariasis eradication by repeated mass treatment. Amer. J. trop. Med. & Hyg. **9**: 274-276, 1960.
4. BROWN, H. W. — Therapy of ascariasis with piperazine. Amer. J. trop. Med. & Hyg. **4**: 947-952, 1955.
5. BROWN, H. W. — The treatment of *Ascaris lumbricoides* infections with piperazine. J. Pediatr. **45**:419-424, 1954.
6. BRUMPT, L. C. & HO-THI-SANG — Traitement de l'ascaridiose et de l'oxyurose par les dérivés de la pipérazine. Bull. Soc. Pathol. éxot. **47**:817-822, 1954.
7. FERNÁNDEZ de CASTRO, J. P. — Tratamiento de la ascaridiasis con dosis unica de piperazina. Medicina, México **38**:425-439, 1958.
8. FIELDS, D. N.; SELLY, G. W. & GUICHERIT, I. D. — The treatment of ascariasis with piperazine. Doc. Med. geogr. & trop. **8**:80-84, 1956.
9. HOEKENGA, M. T. — Experiments in the therapy of human ascariasis. Amer. J. trop. Med. & Hyg. **3**:755-761, 1954.
10. LÓPEZ-RICA, A.; LOYO, C. D.; RETOLAZA, T. D. & BRAVO, M. A. B. — Tratamiento de la ascaridiosis con citrato de piperazina y hexilresorcinol. Rev. Inst. Salubr. & Enf. trop. **15**:187-193, 1955.
11. TARNAY, T. J.; YARDLEY, J. M.; GUICHERIT, I. D. & BROWN, H. W. — Therapy of ascariasis with piperazine and purgative. Doc. Med. geogr. & trop. **9**:176-180, 1957.

Recebido para publicação em 11 janeiro 1961.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
3(1):31-36, janeiro-fevereiro 1961

CDU 616.351-072.1
:576.893.12

CORRELAÇÃO ENTRE OS ACHADOS RETOSSIGMOIDOSCÓPICOS E A PRESENÇA DE RAÇAS DIVERSAS DA *E. HISTOLYTICA*

Mauro Pereira Barretto e Geraldo Avelino da Silva

RESUMO

A retossigmoidoscopia praticada em 275 pacientes com amebíase, revelou a presença de lesões de natureza amebiana, isto é, com trofozoítas da *Entamoeba histolytica*, em 60 ou 21,82% dos casos. Entre 90 indivíduos portadores da "raça" pequena não foram encontradas lesões positivas; mas tais lesões foram observadas em 42 sôbre 129 ou 32,56% dos casos parasitados pela "raça" grande, e em 18 sôbre 56 ou 32,14% dos casos de parasitismo por ambas as "raças". Assim, a presença de alterações patológicas de etiologia amebiana comprovada foi verificada em 60 sôbre 185 ou 32,43% dos pacientes com a "raça" grande, só ou associada à pequena.

Lesões sem trofozoítas da *E. histolytica* foram observadas em 12,22% dos portadores da "raça" pequena, em 10,08% dos infectados com a "raça" grande e em 10,71% dos parasitados por ambas as raças. Estas proporções não diferem significativamente entre si, assim também como não diferem daquela observada entre os indivíduos sem *E. histolytica* nas fezes (14,61%) e referida em trabalho anterior.

Parece, pois, que só a raça grande da *E. histolytica* é capaz de provocar alterações da mucosa, ao menos dos segmentos do intestino grosso acessíveis a uma exploração endoscópica direta, e que aquelas lesões observadas nos casos de infecção pela "raça" pequena (*Entamoeba hartmanni* segundo alguns autores), são inespecíficas, como inespecíficas são algumas lesões presentes em certa proporção de pacientes com a "raça" grande ou em indivíduos sem amebíase.

INTRODUÇÃO

Entre os problemas controversos da amebíase, um dos mais importantes, interessantes e apaixonantes é o que diz respeito à ação patogênica da *Entamoeba histolytica*.

Mesmo antes da descoberta de cistos tetranucleados por Quincke & Roos [29], mas particularmente depois do trabalho de Schaudinn [33] que, em definitivo, distinguiu a *E. histolytica* da *E. coli*, aquela patogênica e responsável pela disenteria amebiana, esta inofensiva e simples comensal do intestino do homem, observadores experimentados como Councilman & Laffleur [12], Musgrave [26] e outros vinham assinalando a ausência de diarréia ou disenteria em casos de amebíase.

Mas foi sobretudo após as experiências clássicas de Walker & Sellards [37] que começou a se difundir o conceito de que a infecção amebiana não se traduz apenas pelos quadros disentéricos graves ou mesmo fulminantes e pelas necroses gigantes do fígado, mas é uma enfermidade proteiforme que se manifesta por uma sintomatologia subjetiva e objetiva extremamente variada. Muito contribuíram para isto os trabalhos de tropicalistas e parasitologistas inglêses e ame-

Fac. Medicina de Ribeirão Prêto, da Univ. de São Paulo — Dep. Parasitologia (Prof. M. P. Barretto) e Hospital Santa Teresa, de Ribeirão Prêto (Dr. Odair de Oliveira).

ricanos. Tomou vulto a teoria segundo a qual a *E. histolytica* é sempre patogênica e qualquer portador do parasito, ainda que assintomático, é um doente em potencial e ao mesmo tempo representa um perigo para a coletividade. O protozoário que alberga em estado de equilíbrio pode, a qualquer momento e por causas ainda não bem conhecidas, ter o seu poder agressivo aumentado e produzir quadros graves e até letais; demais, ao ser transmitido para outros indivíduos, desde logo, pode manifestar-se altamente virulento. Esta teoria tem em CRAIG (1944) e seus seguidores os mais ardentes defensores.

Por outro lado, PROWAZEK [28] descreveu com o nome de *E. hartmanni* uma pequena ameba produtora de cistos quadrinucleados, aparentemente idêntica às espécies posteriormente descritas como *E. minuta* Woodcock e Penfold, 1916, *E. tenuis* Kulnen e Swellengrebell, 1917, *E. minutissima* Brug, 1917. Aceita por NÖLLER [27], BRUMPT [6], CUNHA & MUNIZ [13], SIMIC [34] e mais recentemente por BURROWS [9, 10], FREEDMAN & ELSDON-DEW [19], SARKISIAN [32], como espécies distintas, ela foi considerada por DOBELL [14] como uma raça pequena da *E. histolytica*. Êste último ponto de vista é esposado por um grande número de investigadores, particularmente depois do trabalho de SAPERO, HAKANSSON & LOUTTIT [31], e é amplamente analisado por HOARE [20, 21, 22, 23] e por ELSDON-DEW [15].

Sem pretender entrar na discussão do problema da dualidade racial *versus* dualidade específica, devemos assinalar que, nestes últimos anos se tem avolumado cada vez mais a corrente de opiniões, segundo a qual a *E. histolytica* nem sempre é patogênica, isto é, nem sempre penetra nos tecidos e produz lesão. Admite-se hoje, com algumas variantes, a existência de duas "raças" (ou espécies) biométrica, morfológica e biològicamente distintas: uma grande, patogênica e produtora de lesões, ainda que estas se não manifestem por sintomas dignos de nota, e outra pequena, destituída de agressividade ou pouco patogênica para o homem.

O problema da patogenicidade diversa das duas raças da *E. histolytica* para o homem tem sido abordado de duas maneiras. Alguns autores, como JAMES [24] e FAUST [16], tentaram relacionar a presença de uma ou de outra com os achados de exames necroscópicos. Outros, em muito maior número, procuraram associar os achados parasitológicos com as manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes.

Mas os dados da autópsia, além de difíceis de reunir, são de alcance limitado, ao menos entre nós, onde raramente dispomos de exames coprológicos recentes e cuidadosos dos indivíduos que falecem. Por outro lado, a associação da ocorrência de sintomas diversos com a presença de uma ou outra raça do parasito apresenta dificuldades e perigos, particularmente nos casos de indivíduos poliparasitados e sofrendo de outras enfermidades, o que acontece com a generalidade dos pacientes com amebíase. Como assinalam RIDLEY e SCHOFIELD [30], os sintomas leves, geralmente atribuídos à presença de amebas pequenas, mas que ocorrem também em pacientes infectados pela raça grande, são tão comuns e podem ser provocados por uma multiplicidade tão grande de causas que é impossível se saber com segurança se, em dado caso, êles correm por conta da *E. histolytica* ou são devidos a outras causas.

Ora, visto que um certo número variável de indivíduos com amebíase apresenta lesões da mucosa das porções terminais do intestino, acessíveis a uma exploração direta e sendo fácil determinar a natureza amebiana destas lesões, resolvemos relacionar os achados parasitológicos com as alterações retossigmoidianas observadas ao exame endoscópico de nossos pacientes. Releva notar que, na literatura a nosso dispor, não encontramos referência alguma a esta maneira de abordar o problema.

MATERIAL E MÉTODOS

As observações relatadas no presente trabalho foram realizadas em 275 casos de amebíase na sua maioria (cêrca de 250) portadores assintomáticos ou pacientes crônicos oligossintomáticos, estudados no Hospital Sta. Teresa do Departamento de Assistência aos Psicopatas, no Ambulatório do Hospital das Clínicas e no Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Prêto ou atendidos na clínica particular de um de nós. Cumpre-nos assinalar que se acham

incluídos aqui os pacientes referidos em trabalho anterior (BARRETO & SILVA [3]).

Depois de uma lavagem intestinal, êstes pacientes foram submetidos a um exame endoscópico, durante o qual, além de observar as condições da mucosa, colhemos material de lesões ou áreas suspeitas para diagnóstico etiológico destas, segundo as normas descritas em outro trabalho (BARRETTO & SILVA [2]). Mister se faz assinalar que só consideramos uma lesão retossigmoidiana como positiva quando nela encontramos trofozoítas da *Entamoeba histolytica*.

RESULTADOS

Os resultados obtidos são apresentados no quadro I.

apresentavam lesões de etiologia amebiana comprovada. Lesões com trofozoítas foram também observadas em 18 sôbre 56 ou 32,14% dos pacientes com infecção por ambas as raças, e assim a presença de alterações patológicas de natureza amebiana foi comprovada em 60 sôbre 185 ou 32,43% dos indivíduos infectados pela raça grande, só ou associada à pequena.

Assim, sòmente em pacientes que albergavam a raça grande pudemos registrar lesões amebianas comprovadas, não tendo sido possível demonstrar a presença de trofozoítas em lesões presentes em 12,22% dos casos de infecção pela raça pequena. Aliás, lesões sem trofozoítas ocorrem também em 10,08% dos casos de infecção pela raça grande e em 10,71% dos parasitados por ambas as raças, assim como em 14,61% de

QUADRO I

Prevalência de lesões retossigmoidianas em pacientes com "raças" diversas da *E. histolytica*.

Raça da *E. histolytica* (nas fezes)	Nº de exam.	Lesões					
		Positivas		Negativas		Total	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
Grande	129	42	32,56	13	10,08	55	42,64
Pequena	90	0	—	11	12,22	11	12,22
Ambas	56	18	32,14	6	10,71	20	42,85
Total "grande"	185	60	32,43	19	10,27	79	42,70
Total geral	275	60	21,82	30	10,91	90	32,73

Êstes resultados indicam que 90 sôbre 275 ou 32,73% dos pacientes com amebíase apresentavam alterações patológicas da mucosa retossigmoidiana. Em 30 casos, ou 10,91%, havia lesões nas quais não encontramos trofozoítas, por mais exaustivas que fôssem as pesquisas.

Por outro lado, enquanto entre 90 indivíduos portadores da raça pequena não encontramos uma só vez lesões positivas, entre 129 parasitados pela raça grande, 42 ou 32,56% indivíduos sem amebíase, isto é, com exaustivos exames de fezes negativos, como demonstramos em trabalho anterior (BARRETTO & SILVA [3]). A falta de significância das diferenças entre estas diversas proporções parece corroborar a opinião de que em certo número de indivíduos, parasitados ou não, há lesões inespecíficas, isto é, de etiologia não amebiana, e que são desta natureza aquelas encontradas entre os portadores da raça pequena.

Parece, pois, que só a raça grande é capaz de provocar alterações patológicas da mucosa, ao menos nos segmentos do intestino grosso acessíveis a uma exploração endoscópica direta.

Nossas verificações estão, assim, de acôrdo com a opinião segundo a qual a raça pequena da *E. histolytica* (*E. hartmanni* segundo outros) é pouco patogênica ou apatogênica, opinião esta baseada na observação de que sua presença no tubo digestivo, ou não se revela por manifestações clínicas ou é acompanhada de perturbações digestivas ligeiras que, insistimos mais uma vez, são tão variadas e podem ser produzidas por uma multiplicidade tão grande de causas que se torna difícil ou impossível concluir que sejam devidas às amebas pequenas (BRUMPT [6, 7]; CUNHA & MUNIZ [13]; SIMIC [34]; WENRICH, STABLER & ARNETT [38]; SPECTOR [36]; ANDREWS [1]; SAPERO, HARKANSON & LOUTTIT [31]; FELSENFELD [17, 18]; SONNTAG [35]; COLONNELLO [11]; MORTON, NEAL & SAGE [25]; BUONOMINI e BRACCINI [8]; BROOKE, DONALDSON & BROWN [5]; BURROWS [9]; RIDLEY e SCHOFIELD [30]; SARKISIAN [32] e outros).

A aceitação da existência de duas raças ou espécies distintas, uma pequena, apatogênica ou pouco agressiva, e outra grande, patogênica, não implica em admitir que a presença das amebas grandes no tubo digestivo do homem é sempre acompanhada de manifestações clínicas exuberantes. Ao contrário, tem sido verificado que um certo número de pacientes por elas infectados pode deixar de apresentar sintomas de monta, o que, aliás, acontece com a maioria dos nossos casos. Como explicar isto?

A existência de amostras (independentes do tamanho dos cistos) de maior ou menor virulência, como se admite para outros agentes patogênicos, é defendida por muitos autores, enquanto outros negam esta tese, afirmando que as supostas diferenças de virulência de amostras decorrem, na realidade, de fatôres ligados ao hospedeiro ou ao meio, tais como as bactérias associadas, o regime alimentar do paciente, o estado físico dêste, o "stress", as moléstias intercorrentes, etc. Os fatos de ordem clínica e experimental, cuja citação seria ociosa, são contraditórios e não permitem uma conclusão segura.

SUMMARY

Correlation between rectosigmoidoscopy and occurrence of different races of E. histolytica.

Sigmoidoscopy carried out in 275 cases of amibiasis revealed true amebic lesions in 60 patients or 21.82 per cent. Amongst 90 carriers of the small "race" no positive lesions were found, but pathological changes with trophozoites were seen in 42 out of 129 or 32.50 per cent of patients infected with the large "race" and in 18 out of 56 or 32.14 per cent of individuals harbouring both "races".

Pathological changes of the mucosa without trophozoites were seen in 12.22 per cent of carriers of the small "race", in 10.08 per cent of patients with the large "race" and in 10.71 per cent of cases harbouring both "races". These percentages are not significantly different, and in addition they do not differ significantly from the proportion of lesions observed in *histolytica*-free individuals (14.61 per cent) reported in a previous paper.

Therefore, it seems that only the large "race" of *Entamoeba histolytica* induces pathological changes of the mucosa of the terminal portions of the large intestine visible during endoscopic examinations. It seems also that lesions found in carriers of the small "race" (*Entamoeba hartmanni* of Authors) are inespecific as well as lesions present in some patients infected with the large "race" or in *histolytica-free* persons.

REFERÊNCIAS

1. ANDREWS, S. — The transmission of *Endamoeba histolytica* and amebic disease. South med. J. **35**:693-699, 1942.

2. BARRETTO, M. P. & SILVA, G. A. — Estudos sôbre a amebíase retossigmoidiana. I. Diagnóstico de laboratório das lesões. Rev. brasil. Gastroenterol. **12**:147-160, 1960.

3. BARRETTO, M. P. & SILVA, G. A. — Estudos sôbre a amebíase retossigmoidiana. II. Freqüência de lesões na amebíase crônica. Rev. brasil. Gastroenterol. [no prelo]

4. BARRETTO, M. P.; ZAGO *Fº*, H. & SILVA, G. A. — Ocorrência de duas "raças" da *E. histolytica* distintas pelo tamanho dos cistos. Rev. brasil. Biol. **20**:107-119, 1960.

5. BROOKE, M. M.; DONALDSON, A. W. & BROWN, E. — An amebiasis survey in a Veterans Administration Hospital, Chamblee, Georgia, with a comparison of technics. Amer. J. trop. Med. & Hyg. **3**:615-620, 1954.

6. BRUMPT, E. — Differentiation of the human intestinal amoebae with four-nucleated cysts. Trans. Roy. Soc. Med. & Hyg. **22**: 101-114, 1928.

7. BRUMPT, E. — Précis de parasitologie. 6e. éd. Paris, Masson, 1949.

8. BUONOMINI, G. & BRACCINI, L. — Su la diagnosi parasitologica di amebiasi. Nota II. Proposta di una schema di indagini ai fini di una corretta diagnosi di *E. histolytica*. Riv. ital. Hig. **14**:6-23, 1954.

9. BURROWS, R. B. — *Endamoeba hartmanni*. Amer. J. Hyg. **65**:172-188, 1957.

10. BURROWS, R. B. — Morphological differentiation of *Entamoeba hartmanni* and *E. polecki* from *E. histolytica*. Amer. J. trop. Med. & Hyg. **8**:583-589, 1959.

11. COLONELLO, F. — La responsabilità del medico di fronte alla diagonsi di amebiasi. Rass. med. **28**:161-164, 1951.

12. COUNCILMAN, W. T. & LAFLEUR, H. A. — Amebic dysentery. Johns Hopkins Hosp. Rep. **2**:395-548, 1891.

13. CUNHA, A. M. & MUNIZ, J. — Consideraciones sobre *Entamoeba hartmanni*. Bol. Inst. Clin. quir. **4**:593-599, 1928.

14. DOBELL, C. — The amoebae living in man. London, John Bale & Danielsson, 1919.

15. ELSDON-DEW, R. — The present status of amoebiasis. Internat. Congr. trop. Med. & Malaria, 6th, Lisbon, 1958.

16. FAUST, E. C. — Amebiasis in the New Orleans population as revealed by autopsy examination of accident cases. Amer. J. trop. Med. **21**:35-48, 1941.

17. FELSENFELD, O. — The occurrence of small strains of *Endamoeba histolytica* in the Chicago area. J. Parasitol. **32**(supl.): 8, 1946.

18. FELSENFELD, O. — The significance of the small varieties of *Endamoeba histolytica*. Proc. Amer. Fed. clin. Res. **2**:58-59, 1945.

19. FREEDMAN, L. & ELSDON-DEW, R. — Size pariation in *Entamoeba histolytica*. Nature, London **181**:433-434, 1958.

20. HOARE, C. A. — Amoebiasis in Great Britain with special reference to carriers. Brit. med. J. **2**:238-241, 1950.

21. HOARE, C. A. — The commensal phase of *Entamoeba histolytica*. Exper. Parasitol. **1**: 411-427, 1952.

22. HOARE, C. A. — The enigma of host-parasite relations in amoebiasis. Rice Inst. Pamphlet **45**:21, 1958.

23. HOARE, C. A. — Handbook of medical protozoology. London, Baillière, Tindall & Cox, 1949.

24. JAMES, W. H. — Human amoebiasis due to infection with *Entamoeba histolytica*. Ann. trop. Med. **22**:201-258, 1928.

25. MORTON, T. C.; NEAL, R. A. & SAGE, M. — Indigenous amoebiasis in Britain. Lancet **1**:766-769, 1951.

26. MUSGRAVE, W. R. — Intestinal amebiasis with diarrhea. A study of fifty fatal cases. Philip. J. Sci. (B) **5**:229-231, 1910.

27. NÖLLER, W. — Ueber einige wenig bekannte Darmprotozoen des Menschen und ihre nächsten Verwandten. Arch. Schiffs- u. Tropen-Hyg. **25**:35-40, 1921.

28. PROWAZEK, S. W. — Weiterer Beitrag zur Kenntnis der Entamöben. Arch. Protistenk. **26**:241-249, 1912.

29. QUINCKE, H. I. & ROOS, E. — Ueber Amöben-Enteritis. Wien. med. Wchnschr. **30**: 1089-1094, 1893.

30. RIDLEY, D. S. & SCHOFIELD, F. D. — The comparative pathogenicity of small race *Entamoeba histolytica* and other intestinal parasites. Trans. Roy. Soc. trop. Med. & Hyg. **51**:514-518, 1957.

31. SAPERO, J. J.; HAKANSSON, E. G. & LOUTTIT, C. M. — The occurrence of two significantly distinct races of *Endamoeba histolytica*. Amer. J. trop. Med. **22**:191-208, 1942.

32. SARKISIAN, M. A. — Observations on *Entamoeba hartmanni* (Prowazek, 1912). Med. Parasitol. & parasit. Dis. **26**:618-623, 1957. [Resumo em Trop. Dis. Bull. **58**:1111, 1958]

33. SCHAUDINN, F. R. — Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden (Vorl. Mitt.). Arb. kaiserl. Gesundheitsamte **19**: 547-576, 1903.

34. SIMIC, T. — Infection expérimentale de l'homme et du chien par l'*Entamoeba hartmanni* Prowazek, 1912. Ann. Parasitol. hum. & comp. **13**:234-237, 1935.

35. SONNTAG, K. — Die klinische Bedeutung der Darmptotozoen des Menschen unter besonderer Berücksichtigung der Ruhramöbe, *Entamoeba histolytica*. Deutsch. Arch. klin. Med. **198**:511-525, 1951.

36. SPECTOR, B. K. — Significance of the small variety *Endamoeba histolytica*. Amer. J. publ. Health **26**:813-818, 1936.

37. WALKER, E. L. & SELLARDS, A. W. — Experimental entamoebic dysentery. Philip. J. Sci. (B) **8**:253-331, 1913.

38. WENRICH, D. H.; STABLER, R. M. & ARNETT, J. H. — *Entamoeba histolytica* and other intestinal protozoa in 1,060 college freshmen. Amer. J. trop. Med. **15**:331-345, 1936.

Recebido para publicação em 22 setembro 1960.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
3(1):37-42, janeiro-fevereiro 1961

CDU 616.937.3-092.9
:616.832-091

ESTUDO DO PARASITISMO NA MEDULA ESPINAL DE RATOS NA FASE AGUDA DA MOLÉSTIA DE CHAGAS

Fábio Leite VICHI

RESUMO

O Autor faz um estudo quantitativo dos pseudocistos leishmanióticos, encontrados nos níveis cervical, torácico e lombar da medula de ratos que morreram em fase aguda de moléstia de Chagas.

Determina o número de pseudocistos separadamente para a substância branca e cinzenta e a densidade parasitária encontrada nos três níveis da medula.

O parasitismo, que em alguns animais foi muito intenso, mostrou-se maior na substância cinzenta que na branca. Constatou-se também ser o nível lombar da medula mais parasitado que os outros. Êste último dado pode ser relacionado com a grande incidência de paralisia do trem posterior, verificada em ratos na fase aguda da moléstia de Chagas.

INTRODUÇÃO

A forma nervosa da moléstia de Chagas, no homem, foi magistralmente descrita por CARLOS CHAGAS [2], em 1913. Para esclarecer o quadro patogenético dessa forma da moléstia êle havia sugerido um trabalho experimental a GASPAR VIANNA que, em 1911, pôde observar, em gatos, paralisia do trem posterior [4].

VILLELA e SOUZA CAMPOS, posteriormente, em trabalhos distintos, referem a ocorrência de paralisia do trem posterior em cães [1, 5].

KÖBERLE nota a paralisia do trem posterior de ratos chagásicos como um dos sintomas neurológicos mais freqüentes [3].

São encontrados no sistema nervoso central, durante a fase aguda da moléstia, numerosos pseudocistos leishmanióticos. Observa-se, quando do rompimento dêsses ninhos de parasitos, a existência de reação inflamatória e lesões degenerativas dos neurônios. Tais fatos explicariam então a paralisia.

Havendo preferência de paralisia para o trem posterior, deveria haver na região da medula em que se origina o plexo lombar — intumescência lombar —, um parasitismo mais acentuado.

Em função de demonstrar a possibilidade acima aventada, realizou-se o presente trabalho.

Para efeito de comparação, o parasitismo do nível lombar da medula do rato foi confrontado com aquêles obtidos nos níveis cervical e torácico, cujas células nervosas não emitem prolongamentos nervosos que inervem os membros posteriores.

Fac. Med. de Ribeirão Prêto, Univ. São Paulo — Dep. de Patologia (Prof. F. Köberle).
Trabalho feito com auxílio do Convênio entre o Ministério da Saúde(DNERu) e a Secretaria de Saúde Pública e Assist. Social do Estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 10 ratos Winstar, pesando 35-50 g, injetados com *Trypanosoma cruzi* por via intraperitoneal. A inoculação foi efetuada com 0,15 ml de sangue extraído por punção intracardíaca de ratos que apresentaram parasitemia evidente (15-25 tripanosomas por campo microscópico; objetiva 40x, ocular 8x). Os ratos assim inoculados morreram em fase aguda de moléstia entre o 16.° e o 22.° dia após a infecção. Imediatamente após a morte a coluna vertebral foi dissecada e fixada em solução de formalina a 10%. Os seguintes níveis da coluna foram cuidadosamente seccionados e escolhidos para o estudo da medula:

1 — Nível correspondente às vértebras C_5-C_6, local em que se situa a intumescência cervical-nível cervical.

2 — Nível correspondente às vértebras T_5-T_6-nível torácico.

3 — Nível correspondente às vértebras L_1-L_2, local onde se situa a intumescência lombar-nível lombar.

Os segmentos medulares dessas regiões foram incluídos em parafina. Em cada nível e para cada animal foram feitos 110 cortes seriados, com espessura de 7 micras cada um. A coloração usada foi hematoxilina e eosina.

Admitindo-se como dimensão máxima para um pseudocisto cêrca de 70 micras, de cada 11 cortes seriados, um dêles foi escolhido e a contagem dos pseudocistos efetuada. Com isso evitou-se muito provàvelmente a contagem de um mesmo pseudocisto por duas vêzes.

Usou-se o seguinte critério de reconhecimento de pseudocistos leishmanióticos: células parasitadas por leishmânias com a membrana íntegra ou rôta, ou agrupamentos de leishmânias no espaço intersticial.

Em cada corte dois campos microscópicos (objetiva 40x e ocular 8x) de substância branca e dois de substância cinzenta, situados no eixo transversal da medula e simètricamente opostos, foram examinados (fig. 1). Procurando-se padronizar o exame em todos os cortes, eram examinados na substância branca os dois campos mais internos e na substância cinzenta os dois campos mais externos situados no referido eixo. Entre os dois campos, sempre era deixada uma pequena faixa de difícil caracterização histológica, conforme poderá ser observado no esquema abaixo. Em cada corte foram somados os resultados obtidos para a substância branca e para a substância cinzenta.

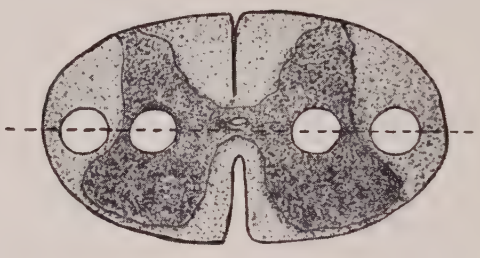

Fig. 1 — Esquema representando os campos microscópicos da substância branca e cinzenta escolhidos para contagem de pseudocistos.

Além disso foram contados também em cada corte o número total de pseudocistos encontrados em tôda extensão da medula.

Com a finalidade de obter-se a densidade parasitária nos três níveis medulares escolhidos, determinou-se a área total dos cortes examinados. Para tal foram êles projetados sôbre papel especial, do qual 1 mg de pêso corresponde a 100 cm^2 de área. As áreas projetadas foram recortadas. Determinou-se a área total dos cortes projetados para cada nível. Conhecida a área de projeção de uma superfície unitária a área total dos cortes projetados foi revertida para a área total real dos cortes examinados.

O número médio de pseudocistos por corte de cada nível foi dividido pela área média de cada nível. Obteve-se assim a densidade parasitária nos três níveis da medula.

RESULTADOS

Os resultados estão expostos nos Quadros I, II e III, bem como nas figuras.

QUADRO I

Número de pseudocistos na medula espinal em 20 campos/animal.

Nº do animal *	Substância branca			Substância cinzenta		
	Nível cervical	Nível torácico	Nível lombar	Nível cervical	Nível torácico	Nível lombar
1	0	0	0	0	0	0
2	1	3	1	0	47	29
3	11	1	3	48	17	45
4	2	2	10	11	50	106
5	4	3	11	48	17	45
6	4	7	14	24	16	66
7	7	8	26	67	40	197
8	22	7	26	94	38	128
9	1	1	46	65	83	173
10	19	62	71	129	355	352
Total	71	91	208	481	665	1.107

* Os animais foram numerados pela ordem crescente do parasitismo na substância branca, no nível lombar.

QUADRO II

Número total de pseudocistos em três diferentes níveis da medula espinal; examinados 10 cortes por nível de cada animal.

Nº do animal	Número de pseudocistos contados em 10 cortes		
	Nível cervical	Nível torácico	Nível lombar
1	41	13	18
2	34	234	194
3	495	178	586
4	154	415	1.089
5	288	131	379
6	333	142	548
7	634	345	2.615
8	1.639	325	1.792
9	550	523	1.777
10	1.839	2.261	3.320
Totais	6.007	4.567	12.318

QUADRO III

Densidade parasitária em três diferentes níveis da medula espinal de ratos, em fase aguda da moléstia de Chagas.

Nível da medula	Área média da superfície de corte (mm^2)	Média de pseudocistos por corte	Densidade parasitária (nº de pseudocistos por mm^2)
Cervical	3,1956	60,07	18,8
Torácica	1,9040	45,67	23,9
Lombar	2,4801	123,18	49,6

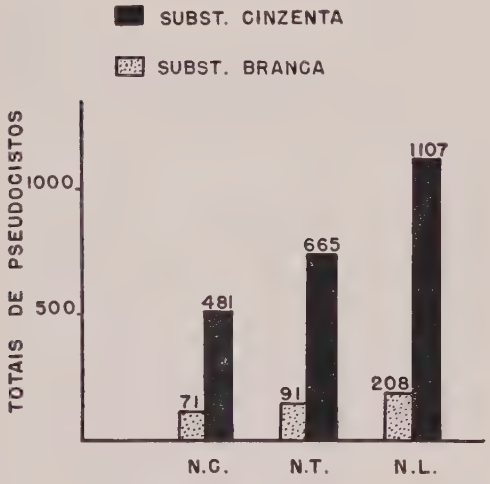

Fig. 2 — Parasitismo pelo *T. cruzi* (número total de pseudocistos) na substância branca e na cinzenta, em três diferentes níveis da medula espinal: N.C. — nível cervical; N.T. — nível torácico; N.L. — nível lombar.

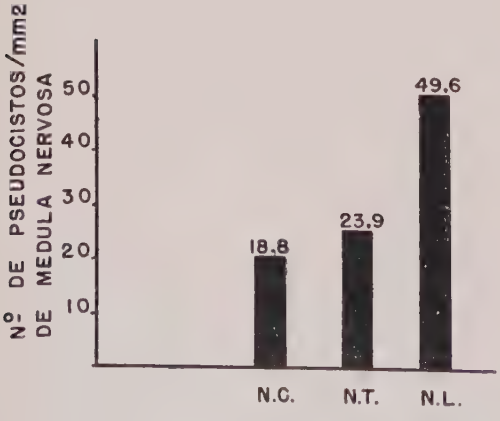

Fig. 3 — Densidade parasitária (número de pseudocistos por mm^2) em três níveis diferentes da medula espinal, em fase aguda da moléstia de Chagas.

Revelam que a densidade parasitária no nível lombar é maior que a dos níveis torácico e cervical. Há sugestão ainda de que o parasitismo diminui à medida que ascende-se na medula.

Os resultados obtidos da contagem dos pseudocistos em áreas iguais da substância branca e da substância cinzenta, mostram igualmente o maior parasitismo no nível lombar. Mostram também ser maior o número de ninhos de parasitos na substância cinzenta que na branca.

INTERPRETAÇÃO E DISCUSSÃO

Relacionando-se a disseminação dos tripanosomas com a via hematógena, a maior densidade parasitária, existente no nível lombar da medula, poderia correr por conta de um fluxo arterial maior neste nível.

Tal possibilidade, entretanto, não pode ser corroborada, por falta de dados a respeito na literatura.

O maior parasitismo encontrado na substância cinzenta em relação à substância branca pode ser explicado pelo fluxo arterial maior existente na substância cinzenta. O metabolismo mais elevado da substância cinzenta, além do mais, propicia um meio mais compatível à vida dos parasitos. Outro fator a se considerar é a existência, na substância cinzenta, de um maior número de células gliais, o que possibilita maior fixação dos parasitos nessa substância.

Como se pode verificar pelo Quadro II, existem grandes variações do parasitismo da medula dos animais usados na experiência.

Em alguns dêles o parasitismo foi acentuadíssimo. O animal n.º 10, animal mais parasitado do lote, apresentou a média de 125,7 pseudocistos/mm² no nível lombar e de 123,2 pseudocistos/mm² de área de medula do nível torácico. Igualmente grande foi a densidade parasitária média, obtida no nível lombar do animal n.º 7 (102 pseudocistos/mm² de tecido). A microfotografia (Fig. 4) dá uma idéia do alto grau de parasitismo que ocorreu na medula de um dêsses dois animais. É de se notar que ambos os animais citados apresentaram paralisia completa do trem posterior.

CONCLUSÕES

Na fase aguda da moléstia de Chagas em ratos, evidencia-se:

1 — maior densidade parasitária no nível lombar da medula;

2 — maior parasitismo na substância cinzenta que na branca;

3 — possível correlação dêsses dados com a paralisia do trem posterior, tão freqüentemente observada.

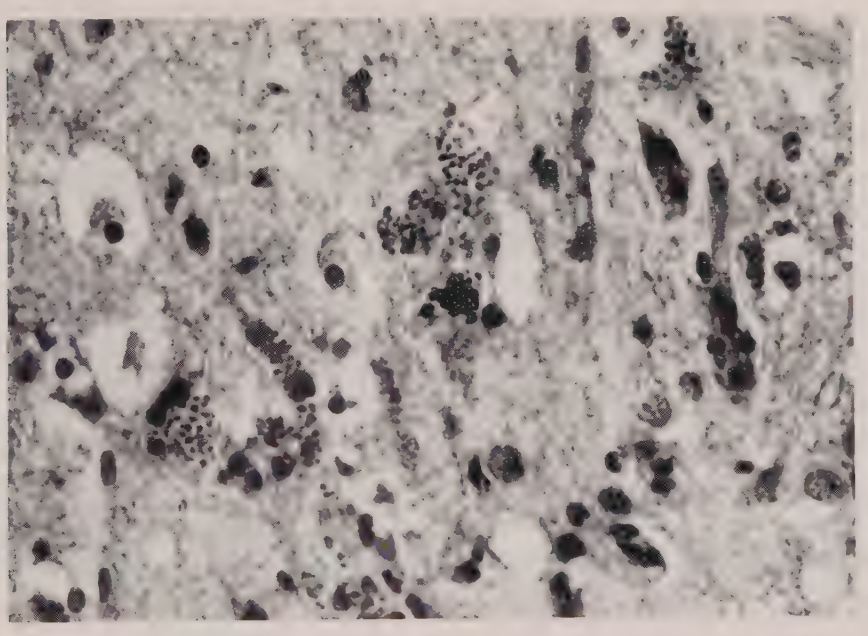

Fig. 4 — Corte da medula de rato em fase aguda da moléstia de Chagas, mostrando intenso parasitismo.

Após a presente experimentação pode ajuntar-se paralelamente ao sintoma de paralisia do trem posterior a existência de maior densidade parasitária na região de origem dos nervos que se dirigem aos membros posteriores do rato. Outros trabalhos, demonstrando agora alterações neuronais da medula em ratos na fase aguda da moléstia de Chagas, poderão melhor esclarecer o assunto.

SUMMARY

Study of parasitism in the spinal cord of rats at acute stage of Chagas' disease.

The Author presents a quantitative analysis of leishmaniotic pseudocysts found at the cervical, dorsal and lumbar levels of the spinal cord of rats dying at the acute stage of Chagas' disease.

The number of pseudocysts was counted in the white and the gray substance, at three

levels of the spinal cord. The lumbar level of the spinal cord was the most intensely parasitized. These data could be closely related to the greater incidence of posterior limb paralysis described in the animals at the acute stage of Chagas' disease.

The parasitism, which was found to be intense in animals, had the peculiar characteristic of being greater in the gray than in the white substance.

REFERÊNCIAS

1. CAMPOS, E. S. — Sur la paraplégie des animaux infectés expérimentalement par le *Trypanosome cruzi* (Chagas 1909). Compt. rend. Soc. Biol. **91**:984, 1924.

2. CHAGAS, C. — Les formes nerveuses d'une nouvelle Trypanosomiase. Nouv. Iconogr. Salpêtrière **26**:1, 1913.

3. KÖBERLE, F. — El mal de Chagas, enfermedad del sistema nervioso. Rev. Med. de Córdoba **47**:2, 1959.

4. VIANNA, G. — Contribuição para o estudo da anatomia patológica da moléstia de Carlos Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **3**: 276-294, 1911.

5. VILLELA, E. — Paralysie expérimentale chez le chien par le *Trypanosoma cruzi*. Compt. Rend. Soc. Biol. **91**:979-983, 1924.

Recebido para publicação em 14 novembro 1960.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
3(1):43-49, janeiro-fevereiro 1961

CDU 616.937.3-092.9-085
:547.722.5

ATIVIDADE TERAPÊUTICA DO 5-NITRO-FURALDEÍDO-SEMICARBAZONA (NITROFURAZONA) EM ESQUEMAS DE DURAÇÃO PROLONGADA NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL DO CAMUNDONGO PELO *TRYPANOSOMA CRUZI*

Z. Brener

RESUMO

A presença de um ciclo sangüíneo do *T. cruzi* e a existência de drogas capazes de destruir um grande número ou a totalidade das formas circulantes do parasito, sugere a possibilidade teórica de erradicação dêsse tripanosoma através da manutenção de uma concentração ativa da substância tripanosomicida por tempo suficientemente longo no sangue, a fim de que a eliminação contínua das formas sangüícolas leve à exaustão do parasitismo.

A fim de testar essa possibilidade foi usado o 5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona (nitrofurazona), administrado por via oral na dose de 100 mg/kg durante 53 dias consecutivos. Em 65 camundongos assim tratados os métodos laboratoriais de contrôle empregados (exame de sangue fresco, subinoculação, xenodiagnóstico, cultura e exame histológico do coração), realizados 1 a 2 meses após o tratamento, demonstraram a persistência da infecção em apenas 3 animais. Cinco animais tratados a partir do dia seguinte à inoculação e posteriormente reinoculados apresentaram típica fase aguda da infecção indicando ausência de imunidade por desaparecimento da infecção.

Em 10 camundongos que receberam apenas 20 doses da droga a persistência de tripanosomas foi assinalada em 8 animais.

INTRODUÇÃO

Apesar da existência de vários medicamentos ativos contra as formas sanguícolas do *T. cruzi*, não se obteve ainda uma droga capaz de curar com regularidade a doença de Chagas experimental ou humana. Entre os compostos usados destacam-se o Bayer 7602 (Ac) ou 3024 (I.C.I.), o Bayer 9736 (As), o sulfato de carbidium, a primaquina, alguns nitrofuranos e, mais recentemente, o aminonucleosídeo da Stilomicina isolado ou associado com a primaquina (Mazza, Cossio & Zuccardi [5]; Mazza, Basso & Basso [4]; Goodwin, Goss & Lock [3]; Pizz [9]; Fernandes, Pereira & Pereira da Silva [2]; Moraes, Lopes Faria & Fernandes [6]; Packchanian [7]).

No presente trabalho estudamos a ação do 5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona (Packchanian [7]) administrado segundo esquemas de duração prolongada, na infecção experimental do camundongo pelo *T. cruzi*.

MATERIAL E MÉTODOS

Inoculação dos animais — Camundongos albinos pesando 18-20 g eram inoculados, por via intraperitoneal, com cêrca de 70.000 tripanosomas da amostra Y (Pereira da Silva & Nussenzweig [11]). Para obtenção do inóculo, camundongos eram sangrados no 8.º dia de infecção, sendo a contagem de

Instituto Nacional de Endemias Rurais. Centro de Pesquisas de Belo Horizonte.

tripanosomas feita segundo a técnica descrita por PIZZI [11] com algumas modificações.

Tratamento — A nitrofurazona apresenta-se sob a forma de um pó amarelado pouco solúvel na água e no éter, mas solúvel em álcool e propileno-glicol. A administração era feita sempre por via oral por meio de sonda estomacal ligada a seringa, sendo a droga suspensa em água destilada na presença de goma arábica.

Os seguintes esquemas de administração da droga foram usados:

a) em 65 animais a nitrofurazona, na dose de 100 mg/kg, foi administrada durante 53 dias consecutivos a partir do 4.º dia de infecção. Em todos os animais o exame de sangue a fresco, feito antes do início da medicação, revelou tripanosomas no sangue circulante.

b) Em 15 animais a droga foi administrada na mesma dose de 100 mg/kg durante 53 dias consecutivos, sendo a medicação iniciada no dia seguinte à inoculação. Em 10 animais tomados como contrôles e infectados com o mesmo inóculo a parasitemia foi assinalada a partir do 5.º dia de doença, tendo a infecção decurso normal que terminou com a morte dos camundongos.

c) Em 15 animais a nitrofurazona foi dada na dose de 100 mg/kg durante 20 dias consecutivos, a partir do 4.º dia de inoculação. Também neste grupo a presença de parasitos foi demonstrada pelo exame de sangue a fresco de todos os animais, realizado antes do início do tratamento.

CONTRÔLE DA ATIVIDADE TERAPÊUTICA

Exame de sangue a fresco — A partir do dia seguinte ao início da medicação foram feitos exames de sangue a fresco entre lâmina e lamínula com sangue colhido da cauda do animal. Os exames eram feitos diàriamente ou em dias alternados, sendo examinados no mínimo 100 campos microscópicos com médio aumento. Êsses exames se estenderam até a 10.ª semana após a inoculação.

Subinoculação — Camundongos tratados foram sacrificados em épocas variáveis entre 1 e 2 meses após o fim do tratamento. Os animais eram anestesiados e, de cada um, cêrca de 0,4-0,6 ml de sangue citratado eram colhidos por secção da veia axilar e injetados intraperitonealmente em dois outros camundongos pesando 14-16 g. Exames de sangue a fresco dêsses animais eram feitos diàriamente uma ou duas vêzes por dia, a partir do 5.º dia após a inoculação, até os 30 dias quando os exames passavam a ser feitos em dias alternados. A pesquisa microscópica de parasitos se estendia até pelo menos a 6.ª semana após a inoculação.

Cultura — Nos animais sacrificados para a subinoculação, parte do sangue colhido era semeado em meio de ágar-sangue, tomando-se o cuidado de também semear sangue de camundongos contrôles não tratados. Em algumas ocasiões fragmentos de coração e baço foram também semeados para pesquisa ulterior de flagelados.

Xenodiagnóstico — Em 20 camundongos tratados foi feito o xenodiagnóstico. Os animais eram anestesiados, imobilizados e deixados sugar por 4 ninfas de triatomíneos até a sua morte por anemia. A pesquisa de formas metacíclicas no conteúdo retal dos "barbeiros" era feita entre 45 a 50 dias após o repasto sanguíneo.

Reinoculação — Em alguns camundongos tratados com 53 doses foi feita a reinoculação de formas sanguícolas do *T. cruzi* após 10 semanas de exame a fresco repetidamente negativo. A fim de acompanhar o decurso da infecção foram feitas contagens diárias de tripanosomas segundo a técnica de PIZZI [11] ligeiramente modificada.

Exame histológico — Em todos os animais sacrificados foram feitos exames de cortes histológicos do coração corados pela hematoxilina-eosina para pesquisa de "ninhos de leishmânia". Em alguns animais, fragmentos do intestino delgado, estômago e baço foram também examinados para pesquisa de parasitos.

RESULTADOS

No Quadro I estão expostos os resultados obtidos em 45 camundongos tratados a partir do 4.º dia de inoculação com 100 mg/kg

BRENER, Z. — Atividade terapêutica do 5-nitro-furaldeído-semicarbazona (nitrofurazona) em esquemas de duração prolongada na infecção experimental do camundongo pelo Trypanosoma cruzi. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 3(1):43-49, 1961.**

QUADRO I

Resultados obtidos em 45 camundongos tratados com 100 mg/kg de nitrofurazona, por via oral, durante 53 dias consecutivos. Em apenas dois animais foi possível comprovar, nos exames realizados 1 a 2 meses após o tratamento, a persistência da infecção chagásica.

Nº	Exame a fresco (4º dia)	Exame de sangue a fresco (Semanas após tratamento) 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Cultura (sangue)	Pesquisa de parasitos (músculo cardíaco)	Subinoculação em camundongos (exame de sangue a fresco) Semanas após inoculação 1	2	3	4	5	6
1	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
13	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
14	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
15	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
16	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
17	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
18	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
19	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
21	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
22	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
23	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
24	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
25	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
26	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
27	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
28	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
29	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
30	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
31	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
32	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
33	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
34	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
35	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
36	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
37	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
38	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
39	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
40	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
41	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—
42	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
43	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
44	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
45	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—

de nitrofurazona administrados durante 53 dias consecutivos. Em apenas 2 animais a subinoculação foi positiva, tendo sido negativos os demais exames.

No Quadro II estão expostos os resultados do xenodiagnóstico em 20 camundongos tratados, a partir do 4.º dia de inoculação, com 53 doses consecutivas de 100 mg/kg de nitrofurazona. Em 19 animais o xenodiagnóstico e os demais métodos laboratoriais resultaram negativos e em apenas 1 camundongo o xenodiagnóstico foi positivo.

Em 15 camundongos medicados também com 100 mg/kg da droga durante 53 dias, mas nos quais a medicação foi iniciada no dia seguinte à inoculação, o exame de sangue a fresco foi repetidamente negativo durante todo o tempo de observação. Cinco camundongos dêsse grupo foram reinoculados, 50 dias após o fim do tratamento, com 80.000 tripanosomas por via intraperitoneal. Foram feitas contagens diárias dos tripanosomas no sangue periférico, observando-se o

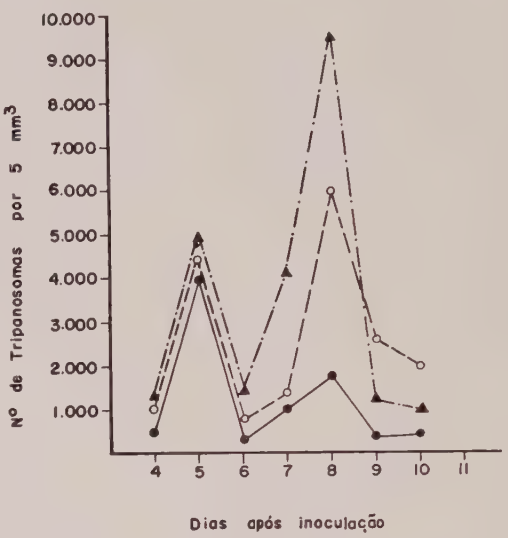

Fig. 1 — Resultado da reinoculação em 3 camundongos tratados com nitrofurazona (100 mg/kg, via oral), a partir do dia seguinte à inoculação deu origem a típica fase aguda.

QUADRO II

Resultados obtidos em 20 camundongos tratados com nitrofurazona na dose de 100 mg/kg, por via oral, durante 53 dias consecutivos. Em apenas um animal o xenodiagnóstico foi positivo.

Nº	Exame a fresco (4º dia)	Exame de sangue a fresco (Semanas após tratamento) 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Xeno-diagnóstico	Cultura baço	Cultura coração	Pesquisa de parasitos (músculo cardíaco)
1	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
9	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
13	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
14	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
15	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
16	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
17	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
18	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
19	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

aparecimento de nítida fase aguda com grande número de tripanosomas circulantes. Na fig. 1 estão expostas as curvas de parasitemia obtidas em 3 dos animais tratados e reinoculados.

Finalmente, no Quadro III, estão representados os resultados da subinoculação de sangue dos 10 animais tratados com apenas 20 doses contínuas de 100 mg/kg de nitrofurazona. Como se pode observar, em apenas dois dos animais sacrificados a subinoculação foi negativa, resultando positiva nos demais.

tem, atualmente, drogas capazes de destruir um grande número ou a totalidade das formas circulantes do *T. cruzi* sugerem a possibilidade teórica de erradicação do parasito se se conseguir manter uma concentração ativa da droga no sangue por tempo suficientemente longo a fim de que a eliminação contínua das formas sanguícolas leve à exaustão da infecção.

No presente trabalho essa possibilidade foi investigada com o emprêgo da nitrofurazona. Essa droga apresenta, para êsse tipo de investigação, as seguintes vantagens: co-

QUADRO III

Resultados obtidos em 10 camundongos tratados com 20 doses consecutivas de nitrofurazona na dose de 100 mg/kg, via oral. Observar que em 8 dos 10 animais houve persistência da infecção chagásica.

Nº	Exame a fresco (4º dia)	Exame de sangue a fresco (Semanas após o tratamento) 1	2	3	4	5	6	Subinoculação em camundongos (Exame de sangue a fresco) Semanas após a inoculação 1	2	3	4	5	6
1	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	+	—	—	—	—	—	—	—	+				
3	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	+	—	—	—	—	—	—	—	+				
5	+	—	—	—	—	—	—	—	+				
6	+	—	—	—	—	—	—	—	+				
7	+	—	—	—	—	—	—	—	+				
8	+	—	—	—	—	—	—	—	+				
9	+	—	—	—	—	—	—	—	+				
10	+	—	—	—	—	—	—	—	+				

DISCUSSÃO

Certos aspectos do ciclo evolutivo do *T. cruzi* fazem supor que tôdas ou pelo menos a grande maioria das formas flageladas libertadas dos tecidos circulam por algum tempo no sangue antes de penetrarem em novas células. A possibilidade de que tripanosomas oriundos dos tecidos possam penetrar por contigüidade em novas células, sem cumprir um ciclo sanguíneo, existe, mas ainda não foi cabalmente comprovada. A presença do ciclo sanguíneo e o fato de que existemo demonstrou PACKCHANIAN [7], a nitrofurazona apresenta nítida ação supressiva destruindo as formas circulantes; aplicada em dose única, a droga ainda está presente no sangue circulante de camundongos após 24 horas (PACKCHANIAN [7]); estudos levados a efeito por PAUL & col.[8] demonstraram que a nitrofurazona, como vários outros nitrofuranos, não se acumula ao nível dos tecidos, pois é ràpidamente degradada por todos êles com exceção do sangue; a droga apresenta baixa toxicidade e, aparentemente, discreta ação cumulativa, já que a mortalidade, após

50 doses consecutivas de 100 mg/kg (equivalente a 1/5 do LD50), foi apenas de 12,5%.

Os resultados apresentados tendem a confirmar o raciocínio aqui exposto, já que, entre todos os animais tratados, apenas em 3 foi possível assinalar a persistência dos tripanosomas. Uma objeção aparente quanto à cura dos animais seria a possibilidade da persistência de "ninhos de leishmânia" viáveis, nos tecidos, por um prazo superior àquele da observação por nós realizada. O desconhecimento de certos dados biológicos essenciais do ciclo vital do parasito leva-nos a considerar êsse fato, embora êle nos pareça pouco provável.

A possibilidade de os métodos laboratoriais de contrôle empregados apresentarem uma sensibilidade insuficiente para detectar infecções com um número pequeno de parasitos também pode ser argüida, mas é preciso lembrar que, em nossa experiência, empregando inúmeras drogas ativas em tipos diferentes de esquemas, êsses métodos foram repetidamente capazes de demonstrar a persistência da infecção. O fato de que reinoculações, levadas a efeito em animais nos quais o tratamento foi iniciado no dia seguinte à inoculação, tenham produzido infecções tìpicamente agudas fala a favor de um não desenvolvimento da imunidade por desaparecimento da infecção. Em animais que foram tratados a partir do 4.º dia de infecção, quando os tripanosomas já se apresentam em número razoável no sangue, as reinoculações foram sempre positivas embora não se tenham obtido altas parasitemias; êstes casos sugerem a persistência de anticorpos protetores.

A ação direta sôbre as formas intracelulares parece-nos também pouco provável em vista dos fracos resultados obtidos com o esquema de 20 doses.

Na experiência de PACKCHANIAN [7], a nitrofurazona mostrou-se dotada sòmente de poder supressivo, sem erradicar a infecção. Embora até 42 doses do medicamento tenham sido aplicadas, não há dados seguros sôbre a continuidade na administração do medicamento. Segundo PACKCHANIAN [7] — "each drug was administered intra-peritoneally in its highest tolerance dose once or twice daily until all the untreated control animals were dead. Daily or weekly therapy of the surviving mice was continued using the same dosage until the animals died or until the acute fatal infection was diverted to a chronic or a latent form".

Considerando os resultados obtidos, seria altamente desejável o emprêgo de esquemas de longa duração com outras drogas ativas contra as formas circulantes.

Tendo em vista a existência de estudos farmacológicos detalhados em relação à nitrofurazona (KRANTZ & EVANS) e o fato de que êsse composto já tem sido empregado em indivíduos com tripanosomíase africana (EVANS, NIEMEGEERS & PACKCHANIAN [1]), justifica-se, ao nosso ver, o seu uso em casos humanos de doença de Chagas.

SUMMARY

Therapeutic activity of 5-nitro-2-furaldehyde-semicarbazone (nitrofurazone) in protracted schemes upon mice experimentally infected through Trypanosoma cruzi.

Considering the existence, in the life cicle of *T. cruzi*, of circulating blood forms, and their susceptibility to certain drugs, an attempt was made to treat experimental Chagas disease following a long-term schedule of drug administration. A complete exhaustion of the parasite strain was expected to occur, despite the inefficacy of the drug against the tissue forms.

Nitrofurazone (5-nitro-2-furaldehyde semicarbazone) was given orally in doses of 100 mg/kg. Fifty three running doses, beginning on the 4th day of infection, were given to 65 mice, 87.5% of which survived and were sacrificed 1 to 2 months after treatment. The laboratory methods used for assessing the drug activity (microscopical blood examination, blood inoculation from the treated mice to young uninfected ones, xenodiagnosis, culture, histological examination) revealed the presence of trypanosomes in only 3 of the treated animals. Reinoculation of 5 infected mice that had been treated since the next day after inoculation resulted in typical acute infection, which indicates a complete absence of immunity.

REFERÊNCIAS

1. EVANS, F.; NIEMEGEERS, K. & PACKCHANIAN, A. — Nitrofurazone therapy of *Trypanosoma gambiense* sleeping sickness in man. Am. J. trop. Med. & Hyg. **6**:665-678, 1957.

2. FERNANDES, J. F.; PEREIRA, J. P. M. & PEREIRA DA SILVA, L. H. — Nucleotide and polynucleotide synthesis in *Trypanosoma cruzi*. IV. Effect of the aminonucleoside of Stylomycin on mouse infections. Exptl. Parasit. **8**:496-501, 1959.

3. GOODWIN, L. G.; GOSS, M. D. & LOCK, J. A. — The chemotherapeutic action of phenanthridine compounds. III. Carbidium ethanesulphonate. Brit. J. Pharmacol. & Chemoth. **5**:287-305, 1950.

4. MAZZA, S.; BASSO, G. & BASSO, R. — Ensayos terapeuticos del producto 9736 (As) Bayer y de su acción comparada con el 7602 (Ac) Bayer en la enfermedad de Chagas. Mis. Est. Patol. reg. argent. **61**:3-81, 1942.

5. MAZZA, S.; CASSIO, R. & ZUCCARDI, E. — Primer caso agudo grave de enfermedad de Chagas comprobado en Tucuman y su tratamiento con Bayer 7602 (Ac). Mis. Est. Est. Patol. reg. argent. **32**:3-18, 1937.

6. MORAES, G. E. S.; LOPES FARIA, J. & FERNANDES, J. F. — Nucleotide and polynucleotide synthesis in *Trypanosoma cruzi*. V. Effects of primaquine, stylomycin derivatives and analogs, on experimentally infected mice. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo **2**:147-154, 1960.

7. PACKCHANIAN, A. — Chemotherapy of experimental Chagas disease with nitrofuran compounds. Antib. & Chemoth. **1**: 13-23, 1957.

8. PAUL, M. F.; PAUL, H. E.; BENDER, R. C.; KOPKO, F.; HARRINGTON, C. M.; ELLS, V. R. & BUZARD, J. A. — Studies on the distribution and excretion of certain nitrofurans. Antib. & Chemoth. **10**:287-302, 1960.

9. PIZZI, T. — Effect of primaquine on experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Proc. Soc. exper. Biol. & Med. **78**:643-644, 1951.

10. PIZZI, T. — Inmunologia de la enfermedad de Chagas. Universidade de Chile, Santiago, 1957.

11. SILVA, L. H. P. da & NUSSENZWEIG, V. — Sôbre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folia clin. & biol. **20**:191-208, 1953.

Recebido para publicação em 5 novembro 1960.

Noticiário

CURSO DE MEDICINA TROPICAL

Teve início no dia 2 de janeiro, o II Curso de Pós-graduação em Medicina Tropical, promovido pelo Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

O curso terá a duração de 3 meses, contando com a participação de 23 alunos procedentes de diversos Estados da União e de médicos estrangeiros, vindos da Venezuela, Argentina e Panamá.

O Instituto foi credenciado pela União das Universidades Latino-Americanas, com sede no México, para servir como Centro de formação de tropicalistas na América Latina.

PRÊMIO "SILVA LIMA" DE MEDICINA TROPICAL

Êste prêmio, instituído pela Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, como homenagem à memória do grande pioneiro e um dos fundadores da escola tropicalista baiana, José Francisco da Silva Lima (1826-1910), destinou-se a assinalar o cinqüentenário da morte do ilustre médico.

Tendo por objetivo incentivar a pesquisa científica entre os médicos da nova geração de tropicalistas, foi o prêmio conferido pela Comissão Julgadora, formada pelos Drs. Leônidas de Mello Deane, Thales de Brito e Luiz Hildebrando Pereira da Silva, à Dra. Achiléa C. Lisboa, anátomo-patologista das Maternidades "Tsylla Balbino" e "Climério de Oliveira", da Faculdade de Medicina da Universidade da Bahia.

O trabalho apresentado pela Dra. Achiléa C. Lisboa, versou sôbre a "Forma congênita da doença de Chagas", tendo sido publicado no vol. 2, n.º 6, novembro-dezembro de 1960, desta Revista.

NOVOS TITULARES DO MINISTÉRIO DA SAÚDE

O Presidente Jânio Quadros nomeou seu Ministro da Saúde o Dr. Edward Catete Pinheiro.

O ilustre médico paraense, que conta com longo tirocínio nos domínios da Saúde Pública, pertenceu ao Serviço Especial de Saúde Pública, onde exerceu o cargo de Diretor da Divisão de Educação Sanitária. Em viagem de estudos aos Estados Unidos, teve ocasião de aprofundar-se em questões de saúde pública e, particularmente, de educação sanitária. Foi posteriormente Diretor do Departamento Estadual de Saúde do Pará.

Deputado eleito, em seu Estado, ocupou a presidência da Assembléia Legislativa do Pará e, interinamente, o cargo de Governador do Estado.

Em solenidade presidida pelo Ministro Catete Pinheiro, foram empossados, por sua vez, os seguintes Diretores daquele Ministério:

Departamento Nacional de Saúde Pública: Bichat de Almeida Rodrigues.

Departamento Nacional de Endemias Rurais: Celso Arcoverde de Freitas.

Serviço Nacional de Tuberculose: Aldo Vilas-Boas.

Departamento Nacional da Criança: Getúlio Lima Júnior.

Instituto Oswaldo Cruz: Joaquim Travassos da Rosa.

Serviço Nacional da Lepra: João Batista Risi.

Divisão de Organização Sanitária: Lincoln de Freitas Filho.

Serviço Nacional de Doenças Mentais: Edmundo Maia.